

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 47/48	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53229 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01899 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. März 2000 (03.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 10 102.7 8. März 1999 (08.03.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FISCHER, Markus [DE/DE]; Ruppertstrasse 10, D-80337 München (DE). BACHER, Adelbert [DE/DE]; Königsbergerstrasse 74, D-85748 Garching (DE). (74) Anwalt: HARTZ, Nikolai; Wächtershäuser & Hartz, Tal 29, D-80331 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu</i> <i>veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: **PROTEIN CONJUGATES, METHODS, VECTORS, PROTEINS AND DNA FOR PRODUCING THEM, THEIR USE, AND
MEDICAMENTS AND VACCINES CONTAINING A CERTAIN QUANTITY OF SAID PROTEIN CONJUGATES**

(54) Bezeichnung: **PROTEINKONJUGATE, VERFAHREN, VEKTOREN, PROTEINE UND DNA ZU DEREN HERSTELLUNG,
DEREN VERWENDUNG, SOWIE ARZNEIMITTEL UND IMPFSTOFFE MIT EINEM GEHALT DERSELBEN**

(57) Abstract

The invention relates to protein conjugates, methods, vectors, proteins and DNA for producing them, their use, and medicaments and vaccines containing a certain quantity of said protein conjugates. According to the invention, supramolecular particles are produced that represent one or more different, randomly selectable structural units in a large number on the surface of an individual, approximately spherical protein molecule. Icosahedral lumazine synthases are used as carrier proteins for peptides or proteins. A DNA fragment that encodes a peptide molecule is fused with a DNA fragment that encodes an icosahedral lumazine synthase by molecular-biological methods. Said DNA fragment is inserted into a cloning vector and transformed with an appropriate host strain. A polypeptide is expressed by gene expression. If certain peptide structures are used as the fusion partners, a post-translational change of said structures can be observed in the host strain. The chimeric peptide is purified and chemically modified if necessary. It is possible to produce icosahedral molecules that contain up to 120 different peptide motifs on their surfaces by mixing. The compounds produced lend themselves as auxiliary agents for carrying out analytical methods (ELISA, biosensors) or for producing vaccines.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Sie dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbare Struktureinheiten in grosser Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren. Ikosaedrische Lumazinsynthasen werden als Trägerproteine für Peptide bzw. Proteine eingesetzt. Ein DNA-Fragment, welches für ein Peptidmolekül kodiert, wird unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren mit einem DNA-Fragment, welches für eine ikosaedrische Lumazinsynthase kodiert, fusioniert. Das DNA-Fragment wird in einen Klonierungsvektor inseriert und in einen geeigneten Wirtstamm transformiert. Auf dem Wege der Genexpression wird ein Polypeptid produziert. Bei der Verwendung von bestimmten Peptidstrukturen als Fusionspartner erfolgt im Wirtstamm eine posttranslationale Veränderung derselben. Das chimäre Peptid wird gereinigt und bei Bedarf chemisch verändert. Desweiteren können durch Vermischung ikosaedrische Moleküle hergestellt werden, die bis zu 120 unterschiedliche Peptidmotive auf deren Oberfläche enthalten. Die entstandenen Verbindungen eignen sich als Hilfsmittel zur Durchführung von Analysenverfahren (ELISA, Biosensoren) oder zur Herstellung von Impfstoffen.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, deren Verwendung, sowie Arzneimittel und Impfstoffe mit einem Gehalt derselben.

Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Die vorliegende Erfindung dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbare Struktureinheiten in großer Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren.

Eigenschaften der Lumazinsynthase und auf Lumazinsynthase basierender artefizieller Proteinkonjugate

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase (im Folgenden als Lumazinsynthase bezeichnet) katalysiert den vorletzten Schritt der Vitamin-B₂-Biosynthese in Mikroorganismen und Pflanzen.

Lumazinsynthasen aus bestimmten Bakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aquifex aeolicus*) bilden hochsymmetrische, ikosaedrische Komplexe aus 60 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 1 MDalton (Bacher und Ladenstein, 1991; Bacher et al., 1980; Ladenstein et al., 1986, 1988, 1994; Mörtl et al., 1996). Röntgenstrukturen der Kapsidhülle der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* sind bekannt (Ladenstein et al., 1988, 1994; Ritsert et al., 1995). Das Protein aus *Bacillus subtilis* kann unter Verwendung von Harnstoff denaturiert und anschließend renaturiert werden. Die Effizienz der Renaturierung läßt sich durch die Zugabe eines Liganden (Substratanalogon), beispielsweise 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion oder 5-Nitroso-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, erhöhen. Die Faltung des renaturierten Proteins ist identisch mit der Faltung der nativen Lumazinsynthase. In Gegenwart des genannten Liganden ist die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* bis pH 10 stabil. Die Umgebung des Inhibitormoleküls ist aufgrund der Röntgenstruktur bekannt. Die Bindungsstelle dieses Liganden wird aus Segmenten

benachbarter Monomeren gebildet (Bacher et al., 1986; Ritsert et al., 1995). Diese Konstellation erklärt den unterstützenden Einfluß des Liganden bei der Renaturierung des hochmolekularen Proteinkomplexes.

Lumazinsynthasen aus verschiedenen Mikroorganismen können in rekombinanten Stämmen von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* effizient exprimiert werden. Die rekombinanten Proteine können in hoher Ausbeute isoliert werden.

Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen an der Oberfläche des ikosaedrischen Kapsidmoleküls. Für Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde dies erstmals durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt (Ladenstein et al., 1988). Durch DNA-Synthese konnte ein optimal an die Kodonverwendung von *Escherichia coli* angepasstes Gen zur Expression der thermostabilen Lumazinsynthase aus dem thermophilen Mikroorganismus *Aquifex aeolicus* erhalten werden. Das Protein kann in hohen Mengen rekombinant erhalten werden. Es ist bei einer Temperatur von 80 °C mindestens eine Woche stabil. Daß bei *Aquifex aeolicus* dieselben strukturellen Verhältnisse wie bei der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* vorliegen, folgt aus der Tatsache, daß Fusionsproteine mit Verlängerung des C-terminalen und/oder N-terminalen Endes zu ikosaedrischen Kapsiden assoziieren können, bzw. daß auch chimäre Proteine, bestehend aus Teilen der Lumazinsynthasen aus *Aquifex aeolicus* und *Bacillus subtilis* hergestellt werden können. Es ist folglich von einer sehr ähnlichen Quartärstruktur auszugehen.

Ikosaedrische Lumazinsynthasen können an ihrer Oberfläche mit Struktureinheiten funktionalisiert werden. Als Struktureinheiten (Biomoleküle) kommen vorzugsweise Oligo- oder Polypeptide mit frei wählbaren Segmenten in Betracht. Die präsentierten Proteine (konjugierte Biomoleküle) sind mit dem Trägerprotein kovalent verbunden (Lumazinsynthase-Konjugat). Unter einem Trägerprotein im Sinne der Erfindung versteht man eine natürliche (unveränderte) oder eine modifizierte Lumazinsynthase, bei der die Primärstruktur verändert wurde. Es können dabei eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht und/oder entfernt und/oder zugefügt und/oder verändert vorliegen. Der Erhalt der ursprünglichen katalytischen Aktivität der Lumazinsynthase ist hierbei nicht erforderlich. Vielmehr können z.B. auch katalytisch inaktive, modifizierte Proteine für alle erfindungsgemäßen Anwendungen eingesetzt werden.

Die Anzahl der konjugierten Biomoleküle auf der Oberfläche des Trägerproteins kann sich über einen weiten Bereich erstrecken, wobei erfindungsgemäß die Oberfläche mit bis zu 60 (an einem Terminus) bzw. 120 (an beiden Termini) bzw. 180 (an beiden Termini plus

Schleifeninsertion) identischen oder in ihrer Struktur verschiedenen Peptidmotiven dekoriert sein kann. Proteinuntereinheiten auf der strukturellen Grundlage von Lumazinsynthase können außerdem auch zu noch größeren, etwa spärlichen Partikeln und zu tubulären Strukturen assembliert werden. Diese Assoziate können weit über 60 Untereinheiten enthalten. Sie besitzen allerdings nicht die strenge, geometrische Regelmäßigkeit der ikosaedrischen, 60-meren Lumazinsynthase-Moleküle.

Die Länge der präsentierten Peptidsegmente kann über einen weiten Bereich variieren, erfindungsgemäß vorzugsweise über 1 - 500 Aminosäuren, wobei die Peptidmotive sowohl unverändert als auch modifiziert vorliegen können.

Erfindungsgemäße Proteine können auch eine oder mehrere Aminosäureanaloga oder nicht natürlich vorkommende Aminosäuren enthalten, die auf biologischem Wege (z.B. mittels Suppressor-tRNA-Techniken, etc.) oder auf chemischen Wege (z.B. über Kopplungsreagenzien, etc.) in die Sequenz eingeführt werden. Ebenso können Modifikationen (z.B. Glykosylierung, etc.) oder Derivatisierung (z.B. Biotinylierung, etc.) vorliegen.

Die zugrunde liegende genetische Information für die Spezifikation der artefiziell in die Struktur der Lumazinsynthaseuntereinheit eingebrachten Peptidabschnitte kann sich dabei von wenigen Codons bis zu mehreren Genen erstrecken, abhängig davon, ob ein Oligopeptid, ein Polypeptid oder ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Protein kodiert werden soll.

Die Oberfläche einer Lumazinsynthase kann auch auf chemischem Wege modifiziert werden, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl an Funktionsbereichen kovalent verknüpft ist.

Die Herstellung von heterooligomeren Lumazinsynthase-Konjugaten erfolgt über einen Dissoziationsschritt und einen nachfolgenden Faltungs/Reassoziationschritt. Die nach der Denaturierung monomer vorliegenden chimären Proteine können beliebig gemischt werden. Da die rekombinierten Untereinheiten jeweils einen konstanten Lumazinsynthaseanteil besitzen, ist eine Renaturierung der Lumazinsynthase Kernstruktur unter Ausbildung der natürlichen ikosaedrischen Struktur möglich.

Immunologische Analysenverfahren auf der Basis des ELISA-Testsystems

Antikörper binden mit hoher Spezifität an bestimmte Zielstrukturen (Antigene). Es wurden Testverfahren entwickelt, die auf dem Nachweis spezifischer Antikörper-Antigen-Komplexe basieren. Um festzustellen, ob ein Antikörper an sein Zielantigen gebunden hat, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Der enzymgekoppelte Immunnachweis (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ist eines dieser Verfahren. Der ELISA kann im Prinzip zur Bestimmung jedes Antigens, Haptens oder Antikörpers ausgearbeitet werden, seine Anwendung hat er heute vor allem in der klinischen Biochemie gefunden. Man mißt damit beispielsweise hämatologische Faktoren sowie die Konzentrationen von Serumproteinen wie z.B. Immunglobuline, onkofötale Proteine und Hormone wie z.B. Insulin. Bei der Diagnostik infektiöser Erkrankungen werden bakterielle Toxine, Mikroorganismen wie *Candida albicans*, *Rotaviren*, *Herpesviren*, *HIV* oder *Hepatitis-B*-Oberflächenantigen auf diese Weise nachgewiesen. Desweiteren werden immunchemische Analyseverfahren zur Antikörperbestimmung, zwecks Diagnose abgelaufener oder ablaufender Infektionskrankheiten (z.B. mit HIV, Hepatitis), angewendet.

Ein ELISA-Protokoll besteht im allgemeinen aus folgenden Teilschritten.

1. Die Probe, die ein spezifisches Molekül oder einen bestimmten Organismus enthalten soll, wird an einen festen Träger gebunden (z.B. Mikrotiterplatte aus Kunststoff).
2. Der Nachweis eines Antigens (Protein, Peptid, Hapten-Konjugat, etc.) erfolgt durch die spezifische Bindung eines spezifischen Antikörpers (primärer Antikörper), der gegen das betreffende Antigen aus 1. gerichtet ist. Hierbei kann der primäre Antikörper selbst markiert sein (z.B. radioaktiv) und daher unmittelbar lokalisiert werden (z.B. Autoradiographie). Alternativ kann entsprechend dem folgenden Absatz weitergearbeitet werden.
3. Häufig erfolgt stattdessen die Zugabe eines zweiten Antikörpers (sekundärer Antikörper), der spezifisch an den primären Antikörper, aber nicht an das Antigen aus 1., bindet. Dieser zweite Antikörper ist häufig chemisch mit einem Enzym gekoppelt (Indikatorsystem), welches eine Umwandlung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt katalysiert (z.B. Alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase, etc.). Der zweite Antikörper ist meistens gegen den konstanten Abschnitt des ersten Antikörpers gerichtet. Nicht gebundene sekundäre Antikörper werden durch Waschen entfernt.
4. Zugabe eines farblosen Substrats und dessen Umwandlung in ein farbiges Produkt.

Erfolgt keine Bindung des primären Antikörpers an die in der Probe vorhandenen Antigene, so wird der primäre Antikörper im ersten Waschschrift entfernt. Folglich kann der enzym-markierte sekundäre Antikörper ebenfalls nicht binden, d.h. der Testansatz bleibt farblos. Ist die betreffende antigene Struktur vorhanden, so kann der primäre Antikörper binden und an diesen der sekundäre Antikörper. Das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym katalysiert die Farbreaktion, deren Produkt sich leicht nachweisen läßt (z.B. photometrisch, etc.). Die gemessene Menge der Enzymaktivität ist dem Gehalt an spezifischem Antigen bzw. Antikörper proportional (aus: Glick, B., Pasternak, J., Molekulare Biotechnologie, Spektrum Akademischer Verlag, 1995, S. 201 ff).

Bei der Durchführung von Bindungstests bedarf es eines Indikatorsystems (z.B. Meerrettich-Peroxidase), welches eine Sichtbarmachung der abgelaufenen Immunreaktion erlaubt. Die Visualisierung beruht auf einer stabilen *Verknüpfung* zwischen dem untersuchten Reaktanten (Antigen oder Antikörper) und einem Indikatorsystem. Als Indikatoren (Amplifikatoren) werden eingesetzt: Fluoreszenzfarbstoffe, Lumineszenzfarbstoffe, Radioaktivität, Enzyme, etc.. Die Indikatoren können kovalent oder nicht-kovalent an die jeweiligen Reaktanten gebunden vorliegen. Als stabile *nicht-kovalente Verknüpfungen* zwischen Indikator und gesuchtem Reaktionspartner dienen z.B. die Antigen-Antikörper-Bindung, die Biotin-Avidin-Bindung oder die Lektin-Bindung.

Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper mit dem Indikator kovalent verbunden.

Die indirekte Anordnung umgeht die Markierung des Primärantikörpers. Der Primärantikörper wird durch einen Antikörper, der mit einem Indikator markiert ist, detektiert. Dieser Sekundärantikörper, der aus einer anderen Tierspezies gewonnen wird, bindet an alle Primärantikörper jeder beliebigen Spezifität aus der ersten Spezies.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion stellt eine Methode dar, bei der drei Antikörper nacheinander zum Einsatz kommen. Der Primärantikörper aus Spezies A wird von einem nicht-markierten Sekundärantikörper aus Spezies B, der im Überschuß vorliegt detektiert. Anschließend folgt die Zugabe eines Tertiärantikörpers aus Spezies A, der mit einem Indikator verknüpft ist. Der Sekundärantikörper (Verbindungsantikörper) wirkt als Brücke zwischen Primär- und Tertiärantikörper. Durch die Verwendung mehrerer hintereinandergeschalteter Antikörper wird eine Steigerung der Empfindlichkeit vermittelt.

Die Sichtbarmachung des gebundenen Primärantikörpers kann alternativ durch andere Bindungssysteme erfolgen. Ein geeignetes System stellt die Avidin-Biotin-Complex-Bindung dar (ABC-System). Hierbei muß der Primär- oder der Sekundärantikörper biotinyliert vorliegen.

Die Indikatoren liegen ebenfalls biotinyliert vor und werden an das tetravalente Avidin unter Absättigung dreier Bindungsstellen gebunden. Die vierte Avidinbindungsstelle kann an den biotinylierten Primär- oder Sekundärantikörper binden. Sind die verwendeten Indikatoren mehrfach biotinyliert, ergeben sich sehr große Avidin-Enzym-Komplexe, die die Empfindlichkeit des Testsystems erhöhen (Anstelle von Avidin kann auch Streptavidin verwendet werden). (aus Bioanalytik, F. Lottspeich, H. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, 1998, S. 91 ff) Bei diesem Verfahren besteht das Problem einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit.

Signalamplifikation durch den Einsatz einer derivatisierten, multimeren Lumazinsynthase in Lösung oder auf einer beliebigen Oberfläche:

1. *Durch Zwischenschaltung eines biotinylierten multimeren Lumazinsynthase-Konjugats (Linkerprotein) zwischen Primärantikörper und Indikator:* Eine Lumazinsynthase, die bis zu 60 Biotinmoleküle (z.B. über einen kurzen Abstandshalter an die Lumazinsynthase gebunden, um eine mögliche sterische Hinderung zu vermeiden) auf ihrer Oberfläche enthält, nimmt dabei aufgrund ihrer sphärischen, multimeren Struktur eine besondere Stellung ein. Die Bindung zwischen Antikörper und Linkerprotein bzw. zwischen Linkerprotein und Indikator erfolgt dabei unter Verwendung einer Avidinbrücke oder einer Streptavidinbrücke. Alternativ dazu, können auch Avidin- oder Streptavidin-markierte Primärantikörper bzw. Indikatoren zum Einsatz kommen. An 59 der 60 Biotinmoleküle auf dem multimeren Linkerprotein können Indikatormoleküle gebunden werden, wobei lediglich ein Biotinmolekül zur Vermittlung einer Bindung zwischen Primärantikörper und Linkerprotein notwendig ist. Durch die resultierende mehrfache Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine extreme Signalverstärkung erreicht, wobei die Signalstärke proportional zur Antigenkonzentration ansteigt.

2. *Durch Einsatz von heterooligomeren biotinylierten Lumazinsynthase-Konjugaten:* Durch die erfindungsgemäße Reassoziaton von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Varianten (beispielsweise eine Kombination von 1-3 Antigen-enthaltenen Lumazinsynthasemonomeren mit bis zu 59 biotinylierten Lumazinsynthasemonomeren), wird ein heterooligomeres Lumazinsynthase-Konjugat erzeugt, welches sowohl einen Reaktanden (z.B. Antigen) als auch mehrere Biotin-Moleküle enthält. An die Biotin-Moleküle können Streptavidin- oder Avidin-vermittelt (oder auch über einen Anti-Biotin-Antikörper) Indikatormoleküle gebunden werden. Exemplarisch sollen im folgenden zwei Einsatzmöglichkeiten besprochen werden: A) Ein Lumazinsynthase-Konjugat, welches 1-5 kurze Peptide von antigen wirksamen viralen

oder bakteriellen Oberflächenproteinen (antigene Determinanten) und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für immobilisierte Antikörper, die aus einem Patientenserum oder anderen Flüssigkeiten stammen. B) Charakteristische Antikörper gegen bestimmte Infektionskrankheiten werden mit Hilfe spezieller immobilisierter Epitope (Teile von Oberflächenproteinen der betreffenden pathogenen Organismen: antigene Determinanten) aus der jeweiligen Körperflüssigkeit gefischt. Ein Lumazinsynthase-Konjugat, welches ebenfalls 1-5 Kopien des oben bezeichneten Epitops und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für die, an das immobilisierte Epitop gebundenen, Antikörper. Eine Farbreaktion wird in beiden Fällen (A und B) durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym, welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung dieses mehrfach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine Signalverstärkung erreicht.

3. *Durch Einsatz von heterooligomeren, nicht biotinylierten, Lumazinsynthase-Konjugaten:* Durch die erfindungsgemäße Reassoziaton von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Varianten wird ein heterooligomeres Lumazinsynthase-Konjugat erzeugt, welches sowohl einen Reaktanden (z.B. Antigen, welches spezifisch Antikörper aus einem Patientenserum binden kann) in einfacher Ausführung, als auch Epitope in mehrfacher Ausführung, welche von Indikator-markierten Antikörpern erkannt werden, enthält. Auch hierbei wird, durch die mögliche mehrfache Bindung von Antikörper-Indikator-Komplexen an das multimere Protein, eine Signalverstärkung erreicht.

Biosensoren

Klassische biochemische Analysenverfahren, wie z.B. der Immunassay, basieren auf chemischen Reaktionssystemen in flüssigem Zustand. Eine mögliche Alternative bietet die Anwendung von Festphasenmeßapparaturen oder Biosensoren. In den letzten Jahren findet die Verwendung von Biosensoren als schnelle und empfindliche Testsysteme zum Nachweis verschiedenster Stoff- und Molekülklassen immer mehr Anwendung. Ein Biosensor besteht aus mindestens drei Bestandteilen: biologischer Rezeptor, Wandler und angegliederte Elektronik. In einem Immunsensor kann der biologische Rezeptor ein Antikörper oder ein Antigen sein, der auf verschiedene Arten an den Wandler gekoppelt ist. In beiden genannten

Variationen ermöglichen die Sensoren die Messung sich spezifisch ausbildender Antigen-Antikörper-Komplexe.

Für den Einsatz als chemische Sensoren in Flüssigkeiten, beispielsweise Seren, sind vor allem Volumenschwinger geeignet. Zu ihnen gehören die Schwingquarze, die auf einer speziell behandelten Oberfläche (je nach Testprinzip) mit antigenen Proteinen oder monoklonalen Antikörpern beschichtet werden. Legt man an diese Quarze eine elektrische Wechselspannung an, so wird der Kristall zu elastischen Schwingungen angeregt, deren Amplitude ein Maximum erreicht, wenn die elektrische Frequenz mit einer der mechanischen Eigenfrequenzen des jeweiligen Quarzes übereinstimmt. Diese Schwingungen lassen sich mit geeigneten Meßsystemen erfassen. Gibt man einen mit Antigenen beschichteten Quarzkristall in eine Lösung, die spezifisch bindende Antikörper enthält, so lagern sich diese an seine Oberfläche an und verändern seine Masse. Dadurch wird eine Veränderung seiner Schwingfrequenz erreicht und zeigt so die Bindung eines Antikörpers an. Neben diesen piezoelektrischen Immunsensoren versucht man, Meßtechniken zu entwickeln, deren Funktionsweise derjenigen von potentiometrischen Elektroden gleicht, die also Ähnlichkeit zu pH-Meßgeräten haben. In diesem Fall zielt man darauf ab, die Veränderung des Potentials zu bestimmen, die bei der Ausbildung der Antigen-Antikörper-Komplexe auf einer dünnen equilibrierten Silicagelschicht an der Oberfläche der pH-Glasmembran entsteht. Eine weitere Möglichkeit der immunsensorischen Messung besteht in der Immobilisierung von Proteinen (Antikörper oder Antigene) auf der Oberfläche einer optischen Faser. Die bei diesem Verfahren am häufigsten genutzten optischen Phänomäne sind interferierende Wellen und Oberflächenplasmonen. Eine interferierende Welle wird gebildet, wenn Licht, das an einer optischen Faser entlang strahlt, intern reflektiert wird. Diese interferierende Welle ist die elektromagnetische Energie, die an der Schnittstelle von Faseroptik und Flüssigkeit entsteht. Die Energie wird absorbiert, wenn absorbierende Moleküle an der Schnittstelle auftreten, so daß der Grad der Absorption proportional zu der Menge des absorbierenden Materials der Schnittstelle ist. Die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, wobei das Antigen oder der Antikörper an die Faseroberfläche gebunden vorliegt, kann so nachgewiesen werden. Bei der 'Surface plasmon resonance' wird ein metallbeschichtetes Glas als optische Einrichtung benutzt, bei der ein intern vollständig reflektierter Lichtstrahl eine induzierte elektromagnetische Oberflächenwelle oder Plasmon hervorruft. Eine nachweisbare Oberflächenplasmonresonanz tritt bei einem bestimmten Einfallswinkel des Lichts auf, der entscheidend vom Refraktionsindex des Mediums, welches an den Metallfilm angrenzt,

abhängt. Somit können Veränderungen in dieser Schicht, wie sie z.B. nach der Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zu erwarten sind, gemessen werden.

Zu den potentiometrischen Immunsensoren sind die ionensensitiven Feldeffekttransistoren zu zählen. Eine Rezeptor (Antikörper, Antigen oder sonstiger Rezeptor) wird dabei auf dem Halbleitertor des Transistors verankert. Die Bindung eines Analyten an die Rezeptorschicht ruft eine Veränderung in der Ladungsverteilung und damit eine Schaltung des Feldeffekttransistors hervor. (Aus Modrow S., Falke D., Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 108; Liddell E., Weeks I., Antikörper-Techniken, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 154 ff). Auch bei diesen Sensorverfahren besteht der Wunsch nach Steigerung der Empfindlichkeit.

Signalamplifikation durch den Einsatz derivatisierter, multimerer Lumazinsynthesemoleküle auf einer signalvermittelnden Oberfläche:

Artefizielle Proteinmoleküle auf der Grundlage der Lumazinsynthese können beim Aufbau eines Biosensors als Trägerprotein z.B. zur Präsentation von antigen wirksamen Fängerpeptiden, zum Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Infektionen dienen. Durch die erfindungsgemäße Ausbildung von gemischten Lumazinsynthese-Konjugaten können die jeweiligen Peptide zusammen mit einem bindungsvermittelnden Biotinmolekül in eine ikosaedrische Struktur eingebaut werden. Auf diese Weise können bis zu 59 identische oder verschiedene antigen wirksame Peptide (z.B. Domänen von viralen Oberflächenproteinen) in Verbindung mit einem Biotinmolekül, auf einem ikosaedrischen Molekül präsentiert werden. Durch Verwendung mehrerer verschiedener multimerer Lumazinsynthese-Konjugate läßt sich eine repräsentative Peptidbibliothek auf einem einzigen Sensor plazieren. Die Bindung der multimeren Lumazinsynthese-Konjugate an die Oberfläche eines Wandlers läßt sich beispielsweise über eine Streptavidin/Biotin-Kopplung ermöglichen.

Die Empfindlichkeit eines derartigen Testsystems wird durch das Anbieten mehrerer antigener Determinanten erheblich gesteigert, da dadurch nicht nur ein, sondern mehrere gegen einen bestimmten Erreger gebildeter Antikörper erfasst werden. Desweiteren ist kein fundiertes Detailwissen über Proteinabschnitte erforderlich, die zur Bindung von Antikörpern beitragen, da mit begrenztem Aufwand mehrere Proteine des betreffenden Erregers auf dem Sensor präsentiert werden können. Da die Streptavidin/Biotin-Kopplung für alle Epitoppräsentationen verwendet werden kann, benötigt man zum Aufbau eines Biosensors immer die gleichen, nämlich Avidin oder Streptavidin beschichtete Oberflächen, d.h. die instrumentelle

Ausstattung muß nicht verändert werden. Die jeweiligen individuellen, epitopräsentierenden oder biotinylierten Lumazinsynthase-Untereinheiten können leicht auf rekombinantem Wege hergestellt werden. Dies hat wesentliche Vorteile bei der Entwicklung bzw. der Evaluierung derartiger Nachweisverfahren.

Durch die Anwesenheit von bis zu 59 Fängerpeptiden in einem Molekül kann die Oberfläche eines Sensor-Chips (z.B. Feldeffekttransistor, Oberflächenplasmon-Wandleroberfläche, etc.) extrem vergrößert werden und dadurch eine enorme Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden. Stabilitätsprobleme und Unspezifitäten sind bei der Verwendung eines thermostabilen Trägerproteins und des Biotin/Streptavidin-Systems nicht zu erwarten.

Ebenso können auch kleine Moleküle durch einfache chemische Kopplung an die Oberfläche gebunden werden. Als Kopplungsorte stehen hierfür singuläre, exponierte reaktive Aminosäuren auf der Oberfläche des sphärischen Proteins zur Verfügung.

Prinzipieller Aufbau eines Schichtsystems auf der Basis einer multimeren Lumazinsynthase: Eine funktionalisierte Lumazinsynthase ist mit 60 gleichen bzw. unterschiedlich modifizierten Untereinheiten über einen Anker (Peptid, Fettsäure, etc.) mit einer Oberfläche (beispielsweise Wandleroberfläche oder sonstige beliebige Oberfläche, die sich schon auf einem Wandler befindet) verbunden. Die Detektionempfindlichkeit für Fremdmolekülbindung auf der Oberfläche der Lumazinsynthase wird dabei durch eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen (beispielsweise Epitope zur Antikörpererkennung, Antikörper zur Detektion von Fremdmolekülen in Lösung oder sonstiger Rezeptoren) erhöht.

Herstellung von Impfstoffen (in vitro)

Impfungen führen zu einer immunologischen Resistenz gegen Krankheitserreger. Impfstoffe dienen überwiegend zur Prävention, das heißt, sie sollen bei den immunisierten Personen einen Schutz aufbauen, der sie bei Kontakt mit dem jeweiligen Erreger vor der Infektion und somit vor der Erkrankung schützt. Der injizierte oder oral verabreichte Impfstoff führt im Organismus zur Bildung von Antikörpern und/oder zu einer zellulären Immunantwort. Infolgedessen wird bei einer künftigen Exposition der infektiöse Organismus abgetötet oder neutralisiert, so daß die Krankheit nicht ausbricht.

Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen sind weltweit ein Hauptfaktor der Morbidität und Mortalität. Durch die zunehmende Resistenzentwicklung gegen so gut wie alle verfügbaren Antibiotika ist auch in Industrieländern eine Verschärfung der

Morbiditätssituation zu erwarten. Die Entwicklung neuartiger Impfstoffe ist auch deshalb von größter medizinischer Bedeutung.

Als Impfstoffe kommen unter anderem attenuierte Viren zur Anwendung. Attenuierte Viren ähneln den krankheitserzeugenden Erregern, sie unterscheiden sich von ihnen jedoch im Hinblick auf das Virulenzverhalten; sie verursachen nur eine begrenzte bzw. abgeschwächte Infektion und induzieren dadurch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern und cytotoxischen T-Zellen. Die molekulare Basis der Attenuierung sind Mutationen im Genom von Wildtypviren. Attenuierte Viren verleihen meist einen sehr guten Impfschutz, der über mehrere Jahre erhalten bleibt, sie bergen jedoch das Risiko, daß sie im Verlauf der abgeschwächten Infektion zur Wildtypform zurückmutieren können.

Eine weitere Möglichkeit zur Immunisierung bei Mensch und Tier besteht in der Präsentation von antigen wirksamen Teilen von viralen Oberflächenproteinen auf anderen, nicht pathogen wirkenden Viren, z.B. Pflanzenviren. Die Genfragmente, die für eine antigene Determinante (z.B. Oberflächenprotein) des pathogen wirkende Virus kodieren werden in das Genom des nicht pathogen wirkenden Virus eingebaut (Dalsgaard et al., 1997). Das Fremdprotein wird zusammen mit einem viralen Protein auf der Oberfläche des nicht-pathogen wirkenden Virus präsentiert. Es können jedoch nicht beliebig große DNA-Fragmente in das Virusgenom integriert werden. Daher muß man genau wissen, welche Proteine des Virus, gegen dessen Infektion ein Impfschutz erzeugt werden soll, für die Auslösung einer schützenden Immunantwort wichtig sind. Ein derartiger Impfstoff kann nicht die Breite einer Immunantwort erzeugen, die beim Ablauf einer Infektion mit dem Wildtypvirus oder seiner attenuierten Variante entsteht. Bei dieser Art von rekombinanten Impfviren beschränkt sich die immunologische Reaktion auf ein ausgewähltes Protein.

Impfstoffe, die aus synthetischen Peptiden mit einer Länge von 15 bis 30 Aminosäuren bestehen, stellen eine Vakzineform dar, die sich heute in der Erprobung befindet. Hier werden einzelne Epitope viraler Proteine, welche die Bildung von neutralisierenden Antikörpern bewirken, ausgewählt und chemisch synthetisiert. Voraussetzung ist auch in diesem Fall ein fundiertes Detailwissen über die Proteinabschnitte, die eine virusneutralisierende Immunantwort hervorrufen können. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität der meisten Viren und der unterschiedlichen Fähigkeit einzelner Individuen, bestimmte Proteinregionen immunologisch zu erkennen, müßten in einem auf synthetischen Peptiden basierenden Impfstoff mehrere verschiedene Epitope miteinander kombiniert werden. Da es abgesehen von Aluminiumhydroxid kein geeignetes beim Menschen einsetzbares Adjuvans, das die

Immunantwort in ausreichender Weise verstärken kann, gibt, ist bislang noch kein Impfstoff verfügbar, der auf synthetischen Peptiden beruht. (Aus Modrow S., Falke D., Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 87 ff)

Im Gegensatz zu kurzen Peptiden eignen sich hochmolekulare Moleküle, u.a. Proteine und trägerfixierte Peptide, da sie ohne die Verwendung von Hilfsstoffen verabreicht werden können, aber dennoch eine gute Immunität liefern, vorzüglich als Impfstoffe. Das redundante Vorkommen antigener Determinanten in hoher Anzahl, wie sie z.B. bei Viren oder Bakterien zu beobachten sind, auf dem immunogenen hochmolekularen Molekül begünstigt dabei die erwünschte hohe Antigenität d.h. die präventive Immunantwort. Als Trägerprotein eignet sich hierfür, insbesondere wegen ihrer ikosaedrischen Struktur, die Lumazinsynthase. Die Lumazinsynthase besteht aus mindestens 60 Untereinheiten, d.h. mindestens 60 gleichartige oder verschiedene antigene Determinanten lassen sich in einem Molekül präsentieren. Die Lumazinsynthase ist hochmolekular aufgebaut und hat eine mit einigen Viren vergleichbare Oberflächenstruktur, d.h. eine hohe Antigenität ist zu erwarten. Derartige Impfstoffe sind frei von viralen Genen und sie lassen sich mit relativ geringem Aufwand in hohen Mengen herstellen. Da große Teile der Virusproteine präsentiert werden können, ist in diesem Fall kein fundiertes Detailwissen über die Proteinabschnitte, die eine virusneutralisierende Immunantwort hervorrufen können, erforderlich.

Die gentechnisch hergestellten Proteine, welche Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, beruhen auf der kovalenten Verknüpfung einer Wildtyp-Lumazinsynthasesequenz oder einer modifizierten Lumazinsynthase mit Teilstrukturen von Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen oder Toxinen. Die Verknüpfung kann dabei am N-Terminus und/oder am C-Terminus der Lumazinsynthase erfolgen. Außerdem können die zu präsentierenden Peptide an geeigneten Stellen der Lumazinsynthaseuntereinheit so in die Sequenz eingefügt werden, daß sie in Form einer Schleife auf der Oberfläche des Multi-Untereinheiten-Proteins präsentiert werden. Damit kann eine gegebene immunologische Determinante in einer definierten hohen Anzahl, z.B. erfindungsgemäß bevorzugt 60-fach oder 120-fach, auf einem ikosaedrischen Molekül aus 60 Untereinheiten mit der Triangulationszahl $T = 1$, präsentiert werden. Außerdem können auch höhermolekulare Assoziate hergestellt werden, welche mehr als 100 Untereinheiten enthalten (Triangulationszahl $T = 2$ oder höher) und damit eine noch größere Anzahl Epitope präsentieren können.

Die erfindungsgemäße Assoziation von Untereinheiten mit unterschiedlichen, gentechnisch aufgepfropften Peptid- oder Proteinsequenzen bietet auch die Möglichkeit zur Herstellung von

Proteinmolekülen, welche mehrere unterschiedliche antigene Sequenzen auf **einem** gegebenen Molekül präsentieren können.

DNA-Impfstoff

Seit dem Beginn der 90er Jahre wird auch die Möglichkeit zum Einsatz von DNA als Impfstoff untersucht. Die verwendeten Nukleinsäuren enthalten Gene oder Teile von Genen eines pathogenen Organismus, die ein immunogenes Protein spezifizieren. Für die Entwicklung dieser Vakzine ist detailliertes Wissen über die immunologisch wichtigen Komponenten von großem Nutzen. Die verwendeten Gene kodieren überwiegend für die Oberflächenkomponenten eines Erregers oder auch für Teile von bakteriellen Toxinen. Sie werden zusammen mit regulatorischen Elementen zur Kontrolle ihrer Expression in ein Vektorsystem integriert und als gereinigte DNA intramuskulär injiziert und dort exprimiert. Insbesondere in Muskelzellen ist die DNA über lange Zeiträume als Episom nachweisbar, da sie offensichtlich nur sehr langsam abgebaut wird. Wenn die entsprechenden Gene exprimiert werden, kann der Organismus sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort entwickeln. Diese Form der Impfstoffe wurde bisher im Tiersystem erprobt.

Genkonstrukte, welche Fusionsproteine bestehend aus Proteinkomponenten pathogener Mikroorganismen und aus Lumazinsynthase spezifizieren, sind grundsätzlich als DNA-Impfstoff geeignet. Ein DNA-Vakzin, bestehend aus einem Gen kodierend für eine Lumazinsynthase (partikelbildende Komponente) und einem ausgewählten Gen des Erregers kann intrazellulär exprimiert werden und kann so eine relativ lang anhaltende Produktion des Immunsystem stimulierenden Antigens gewährleisten. Nach den bisherigen Erfahrungen mit Lumazinsynthase aus verschiedenen Organismen sollte der Zusammenbau des Ikosaeders in vivo ohne Hilfsmoleküle (vgl. Chaperonine) möglich sein.

Orale Impfstoffe auf pflanzlicher Basis

Ist bekannt, gegen welche immunologisch wichtige Proteinkomponente des Erregers eine schützende Immunantwort induziert wird, kann das für dieses Peptid kodierende Gen in einen eukaryoten Expressionsvektor eingebracht werden. Nach Transformation von Pflanzenzellen mit dieser DNA können transgene Pflanzen erhalten werden, welche das betreffende Gen exprimieren. Durch Verzehr von Teilen dieser transgenen Pflanze wird auch die ausgewählte Proteinkomponente in den Körper aufgenommen und kann dort eine Immunantwort induzieren.

Als partikelbildendes Protein eignet sich insbesondere die Lumazinsynthase, an die Teile von immunologisch wirksamen Proteinen des Erregers fusioniert sind. Durch Verwendung einer

thermostabilen, partikelbildenden Lumazinsynthase (z.B. aus *Aquifex aeolicus*) als Trägerprotein kann sogar ein kochfester Impfstoff erzeugt werden.

Multifunktional derivatisierte Immuntherapeutika auf der Basis der multimeren Lumazinsynthase

Impfstoffe sollen die Vermehrung eines Krankheitserregers und damit eine Infektion verhindern. In einigen Fällen ist es schwierig, einen zuverlässigen Impfstoff zu entwickeln, da der pathogene Organismus für Antikörper nicht zugänglich ist, oder wie im Fall der erworbenen Immunschwäche (AIDS) zu wenig über den Erreger (HIV) bekannt ist. Die Zielzellen von HIV sind Helfer-T-Lymphozyten (Helferzellen) des Immunsystems, wobei die wichtigsten Funktionen dieser Zellen gestört werden. Wenn HIV in eine Helferzelle eindringt, ist das Virus vor dem immunologischen Angriff geschützt. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann die infizierte Zelle durch die Produktion und die Freisetzung von HIV-Partikeln zerstört werden. Eine infizierte Zelle kann dabei zu einer „Fabrik“ für die Produktion weiterer Viruspartikel werden. Die Konsequenz einer HIV-Infektion ist vor allem, daß das Immunsystem keinen Schutz mehr vor gewöhnlichen Infektionskrankheiten bieten kann. Der erste Schritt bei einer HIV-Infektion ist die Wechselwirkung eines 120 kDalton-Glykoproteins (gp120) aus der Virushülle und dem CD4-Rezeptor an der Oberfläche der Helferzellen. Antikörper gegen CD4 blockieren in vitro die HIV-Infektion von Helferzellen. Auch bei einem Überschuß an freiem CD4-Protein geht die Infektionsrate in vitro zurück. Die Entwicklung eines Fusionsproteins aus einem Teil des CD4-Proteins und aus dem Fc-Anteil eines Immunglobulins stellt den Versuch dar, sowohl den Schutz der Helferzellen als auch die Abtötung des Virus zu erreichen. Das Fusionsprotein wird CD4-Immunadhäsine genannt. Das Molekül bindet an gp120 und blockiert das HIV; beides sind Funktionen des CD4-Anteils. Die Fähigkeit des Fusionsproteins, an Zellen mit Fc-Rezeptoren zu binden, und die lange Halbwertszeit im Plasma sind hingegen auf den Immunglobulinanteil zurückzuführen. Nach der Bindung des Immunadhäsins an das freie Virus oder an HIV-infizierte Zellen kommt es zu einer antikörperabhängigen, zellvermittelnden cytotoxischen Reaktion, die zur Zerstörung des Virus oder der HIV-infizierten Zelle führt. (aus: Glick, B., Pasternak, J., Molekulare Biotechnologie, Spektrum Akademischer Verlag, 1995, S. 245).

Durch die Verwendung einer multimeren derivatisierten Lumazinsynthase könnte sich die Effizienz dieser Strategie verbessern lassen. Es kann eine funktionalisierte Lumazinsynthase zur Verwendung kommen, die sowohl über CD4-Protein-Anteile, als auch über Fc-Anteile

verfügt. Da pro Molekül nicht nur eine funktionelle Einheit, sondern viele dieser Einheiten, vorhanden sind, sollte sich die Effizienz erheblich steigern lassen.

Anstelle des CD4-Anteils könnte man in das multimere Protein auch Antikörper (z.B. speziell entwickelte „Single-chain-Antikörper“), die beispielsweise spezifisch gegen einen Tumormarker (z.B. gegen das Teratocarcinom-Antigen) gerichtet sind, einführen und dieses funktionalisierte Fusionsprotein zur Krebstherapie einsetzen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Kombination eines Antikörpers gegen einen Tumormarker mit Metallothionein. Die multimere Lumazinsynthase ist dabei mit einem Anti-Tumor-Antikörper und bis zu 59 Metallothionein-Molekülen dekoriert. Die Metallothioneinmoleküle wiederum werden mit radioaktiven Elementen (mit relativ kurzer Halbwertszeit), welche für eine Strahlentherapie geeignet sind (beispielsweise Technetium 99) beladen. Im Laufe der Therapie bindet der Proteinkomplex über seinen Antikörper-Anteil an den Tumor und führt dabei die Strahlenquelle direkt an das Tumorgewebe heran. Ähnliche Konstrukte können auch für diagnostische Zwecke, z.B. zur radioaktiven Detektion einer möglichen Krebserkrankung, eingesetzt werden.

Verwendung von Lumazinsynthase-Konjugaten bei der Charakterisierung und Reinigung von Antikörpern

Die Grundlage der Fremdpeptide bilden DNA-Sequenzen, die für ein bestimmtes Epitop (antigene Determinante) kodieren. Die Sequenz der zusätzlichen Peptidsegmente kann durch entsprechende Wahl der DNA-Sequenz exakt bestimmt werden. Es können aber auch Peptidsequenzen eingebaut werden, die in ihrer gesamten Länge oder in Teilabschnitten eine stochastische Aminosäuresequenz besitzen. Eine vielfältige, zufallsorientierte Variabilität dieser Peptide kann durch den Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden, die über einen zufällig (randomisiert) generierten Sequenzabschnitt verfügen, erreicht werden, so daß repräsentative Peptidbibliotheken entstehen. Diese zufällige generierten Peptide werden erfindungsgemäß auf der Oberfläche der Lumazinsynthase präsentiert und sind somit auch für eine Antikörperbindung zugänglich.

Die erhaltenen Lumazinsynthase-Varianten (mit einer zufallsorientierten Variabilität des Fremdpeptids) können z.B. zur Charakterisierung von Antikörper-Bindungsstellen verwendet werden. Durch die Isolierung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit anschließender Sequenzierung des gebundenen Peptidanteils (N-terminale Edman-Sequenzierung oder

Sequenzbestimmung mittels Massenspektroskopie), kann die Selektivität der Bindungsstelle eines Antikörpers charakterisiert werden.

Desweiteren kann gezielt nach Antikörpern, die über eine bestimmte Antigenerkennung (Antigensequenz in diesem Fall bekannt) verfügen, gesucht werden. Durch den Einsatz von Misch-Konjugaten, d.h. Lumzinsynthase-Konjugaten, die sowohl über ein gewünschtes Fremdpeptid (in mehrfacher Ausführung), als auch über einen biotinylierten Anteil (in einfacher Ausführung) verfügen, können selektiv Antikörper aus einer Mischpopulation gereinigt werden. Die Verwendung von Streptavidin oder Avidin gekoppelt an eine feste Phase bietet sich hierfür an. Die Reinigung kann erfindungsgemäß aber auch auf der Basis von anderen Affinitätsmaterialien erfolgen. Die Elution der Antikörper erfolgt durch bekannte Standardmethoden.

Lösung der beschriebenen technischen Probleme

Die Lösung der oben beschriebenen technischen Probleme wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt. Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Lumazinsynthase-Molekülen als Trägerprotein für Fremdproteine, Peptide und/oder sonstige organisch-chemische Moleküle. Ferner ist Gegenstand dieser Erfindung ein Verfahren zum selektiven, rekombinanten Einbau der obengenannten Fremdproteine, bzw. Peptide sowohl in Schleifen (loops) oder erfindungsgemäß vorzugsweise am N-Terminus und/oder am C-Terminus von Lumazinsynthasen. Das Verfahren beinhaltet eine *in vivo* Assoziation von unterschiedlichen Lumazinsynthase-Konjugaten auf dem Wege einer Koexpression der betreffenden Gene in einer Zelle. Ferner beinhaltet das Verfahren die Möglichkeit der *in vitro* Reassoziations von individuell gestalteten Lumazinsynthase-Konjugaten zu sphärischen Partikeln auf dem Wege der Denaturierung/Renaturierung von monomeren Untereinheiten, die sowohl mit als auch ohne die Verwendung eines faltungsunterstützenden Liganden durchgeführt werden kann.

Bereitgestellt werden Lumazinsynthase-Konjugate, die über ein biotinylierfähiges Peptid (Tucker und Grisshammer, 1996; Schatz, 1993; Cronan, 1990) am C-Terminus verfügen.

Desweiteren wird ein artefizielles Lumazinsynthase-Molekül bereitgestellt, welches an seinem C-Terminus über eine gut zugängliche basische Aminosäure (Lysin) verfügt. Ferner wird ein Lumazinsynthase-Molekül bereitgestellt, welches über ein, gut zugängliches Cysteinmolekül am C-Terminus verfügt. Beide Varianten eignen sich zur chemischen Kopplung von

organischen Molekülen. Die Kopplung kann z.B. erfolgen durch Herstellung einer Säureamidbindung oder einer Disulfidbindung zwischen Protein und Kopplungskomponente. Die chemische Kopplung nach dem Amidprinzip kann auch erfolgen an Lysinreste, die natürlicherweise auf der Oberfläche von Lumazinsynthasemolekülen vorkommen.

Desweiteren wird eine thermostabile ikosaedrische Lumazinsynthase (aus *Aquifex aeolicus*) bereitgestellt, die sich unter anderem als Trägerprotein zur Herstellung von besonders stabilen Lumazinsynthase-Konjugaten eignet.

Das Verfahren zur Herstellung von Lumazinsynthase-Konjugaten beinhaltet folgende Teilschritte:

I. Präparation des Fusions-Vektors

- A) Gewinnung einer DNA, die ein Gen für eine Lumazinsynthase enthält (z.B. durch Isolierung aus einem Organismus, durch PCR-Amplifikation mit natürlich vorkommender RNA oder DNA als Matrix, oder durch DNA-Synthese)
- B) Einführung von geeigneten Restriktionsschnittstellen zur späteren Insertion von Fremd-DNA in das Lumazinsynthasegen; Anpassung der Lumazinsynthasesequenz an besondere Anforderungen mit Hilfe bekannter molekularbiologischer oder biochemischer Mutagenesemethoden; Insertion der DNA in einen Klonierungsvektor unter Verwendung bekannter molekularbiologischer Methoden. (Alternativ hierzu kann der für das Fremdpeptid kodierende DNA-Abschnitt direkt unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und synthetischer Oligonukleotide mit dem Lumazinsynthasegen fusioniert werden, wobei II.D gewährleistet sein muß)
- C) Transformation von Wirtszellen mit dem entstandenen Plasmid
- D) Selektion der Transformanden mit Hilfe von Antibiotika oder anderen Selektionsverfahren
- E) Analyse der Transformanden mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Verfahren, wie z.B. Restriktionskartierung, Sequenzierung, Messung einer enzymatischen Aktivität, etc.

II. Insertion einer für ein Fremdpeptid kodierenden DNA

- A) Klonierung der Fremd-DNA mit Hilfe molekularbiologischer Methoden oder synthetische Herstellung einer DNA unter Verwendung chemischer Verfahren
- B) Analyse der DNA unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren

- C) Präparation der für das fusionierende Fremdpeptid-kodierenden DNA
- D) Insertion der präparierten DNA an das 5'- und/oder an das 3'-Ende und/oder in eine Schleifenregion des Lumazinsynthasegens im unter I. präparierten Vektor, so daß eine Fusion des Fremdgens mit dem Lumazinsynthasegen stattfindet. Die Klonierung hat so zu erfolgen, daß alle verwendeten Leserahmen im korrekten Leseraster eingebaut sind, damit die fusionierten Gen-Fragmente gemeinsam als Fusionsprotein translatiert werden.
- E) Transformation von Wirtszellen mit dem entstandenen Plasmid
- F) Selektion der Transformanden mit Hilfe von Antibiotika oder anderen Selektionsverfahren
- G) Analyse der Transformanden mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Verfahren, wie z.B. Restriktionskartierung, Sequenzierung, Messung der enzymatischen Aktivität, etc.

III. Expression und Reinigung der hybriden Polypeptide

- A) Fermentation des Wirtsstammes mit der fusionierten artefiziellen DNA unter Verwendung bekannter mikrobiologischer Methoden.
- B) Expression der fusionierten artefiziellen DNA in den transformierten Wirtszellen als chimäres Protein. Die Expression der artefiziellen DNA kann eine beabsichtigte post-translationale Veränderung des chimären Proteins *in vivo*, z.B. Phosphorylierung, Glycosylierung, Biotinylierung, etc. einschließen.
- C) Präparation eines Zellextraktes mit dem fusionierten Polypeptid
- D) Reinigung des Fusionsproteins mittels chromatographischer oder sonstiger Methoden
- E) Falls erforderlich: Solubilisierung und *in vitro* Faltung (Renaturierung)
- F) Falls erforderlich: Chemische Modifizierung der Oberfläche von Lumazinsynthase-Varianten
- G) Falls erforderlich: *In vitro* Assoziation unter Kombination unterschiedlicher Lumazinsynthase-Varianten

Weitere Erläuterung des Verfahrens:

Bei Verwendung der vorliegenden Erfindung können eine Vielzahl verschiedener Vektoren zur Anwendung kommen. Extrachromosomale (episomale) Vektoren (z.B. Plasmide), Integrationsvektoren (z.B. Lambda-Vektoren), *Agrobacterium tumefaciens*-basierte Vektoren

für Pflanzen (z.B. Ti-Plasmid). Erfindungsgemäß bevorzugt sind Plasmidvektoren. Verwendete Plasmide können aus natürlichen Quellen isoliert oder synthetisch hergestellt worden sein. Das ausgewählte Plasmid sollte mit dem betreffenden Wirtstamm kompatibel sein. Dazu sollte es u.a. über einen geeigneten, zum Wirtstamm passenden Replikationsursprung verfügen. Ferner sollte die Kapazität des Vektors sowohl für die verwendete Lumazinsynthese-Variante als auch für das fusionierte Fremdpeptid ausreichend sein. Desweiteren sind auf dem Plasmidvektor singuläre Schnittstellen zur Klonierung von DNA-Fragmenten erforderlich. Der Plasmidvektor sollte über geeignete Selektionsmechanismen, wie z.B. über ein Resistenzgen verfügen. Die Selektion ist notwendig, um Wirtszellen mit oder ohne Plasmid unterscheiden zu können.

Falls *Escherichia coli* als Wirtstamm ausgewählt wird, so sind erfindungsgemäß Vektoren, die über eine Promotorsequenz aus dem Bakteriophagen T5 oder T7, über eine Operatorsequenz, bevorzugt die Operatorsequenz aus dem *Escherichia coli* Lactose-Operon (*lacI*), über eine Klonierungskassette mit mehreren singulären Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und eine effiziente Terminationssequenz verfügen, bevorzugt. Ferner sollte der Vektor über einen Replikationsursprung verfügen, der eine hohe Kopienzahl der extrachromosomalen DNA in der Wirtszelle erlaubt.

Prokaryotische Expressionssysteme sind im allgemeinen gut geeignet zur rekombinanten Herstellung von erfindungsgemäßen Proteinkonjugaten. In einigen Fällen können jedoch posttranslationale Veränderungen notwendig sein, die in prokaryonten Organismen nicht eingeführt werden können. Eukaryote Proteine können beispielsweise in Prokaryoten nicht glykosyliert oder phosphoryliert werden. Vorzugsweise werden daher eukaryote Fremdproteine (fusioniert an die Lumazinsynthese), welche eine derartige posttranslationale Modifikation benötigen, unter der Kontrolle eines starken Promotors (z.B. AOX1) in niedrigen Eukaryoten (z.B. *Pichia pastoris*) oder unter der Kontrolle eines für Säugerzellen spezifischen Promotors (z.B. Ratten-Preproinsulin-Genpromotor) in Säugetierzellen (z.B. COS7-Affen-Nieren-Zellen) oder eines für Insektenzellen (z.B. Baculovirus, *Autographa californica*) spezifischen Promotors (z.B. Polyhedrinpromotor) exprimiert. Die verwendeten Vektoren sollten zu diesen genannten Wirtstämmen kompatibel sein.

Zur Herstellung von oralen Impfstoffen auf pflanzlicher Basis bieten sich z.B. Vektorsysteme auf der Basis des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* an. Als Alternative zur Genübertragung bei Pflanzen (z.B. bei monokotylen Pflanzen, wie Reis, Weizen, Mais, etc.) eignen sich physikalische Methoden (z.B. Beschuß mit Mikroprojektilen (Biolistik)).

Es können sowohl natürlich vorkommende Proteine als auch synthetische Proteine, die in der Natur nicht vorkommen, an das Trägerprotein (Lumazinsynthase) fusioniert werden. Als DNA-Quellen kommen z.B. Viren, prokaryote (Eubakterien, Archaea) und eukaryote Organismen (Pflanzen, Tiere) in Frage. Die zu fusionierende DNA kann auch synthetisch, unter Verwendung hierfür üblicher Methoden, hergestellt werden. Ferner kann die DNA auch mit Hilfe von Reverser Transkriptase aus mRNA hergestellt werden.

Die rekombinant erzeugten Plasmid-Vektoren werden zur Transformation von Wirtszellen verwendet. Erfindungsgemäß bevorzugt sind gut charakterisierte Bakterienzellen. Die Wirtszellen können auch eukaryote Zellen sein. Verwendete Wirtsstämme sollten über die zur Expression des fusionierten Polypeptides notwendige enzymatische Ausstattung verfügen. Transformationstechniken sind dem Fachmann bekannt. Protokolle hierfür sind bei Maniatis et al. (1982) beschrieben. Nach der Transformation erfolgt eine Analyse der Transformanden. Die Plasmide werden isoliert und mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, wie Restriktionsanalyse, DNA-Sequenzierung, charakterisiert.

Die Expression einer klonierten DNA-Sequenz in einer prokaryoten oder eukaryoten Wirtszelle ist aus dem Stand der Technik bekannt. Die Kultivierung der transformierten Wirtszelle bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Gewinnung von rekombinanten Fusionsproteinen findet unter solchen Bedingungen statt, die für die Expression der DNA-Sequenz förderlich sind. Der Zellaufschluß nach der Expression kann durch alle hierfür üblichen Methoden ausgeführt werden. Die aufgeschlossenen Zellen werden unter Verwendung bekannter Trennverfahren in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt.

Sollte sich das Fusionsprotein in Form von Einschußkörpern in der unlöslichen Fraktion befinden, so wird der nach einer Zentrifugation verbliebene Zellrückstand gewaschen und anschließend durch Zugabe eines Solubilisierungsmittels, gelöst. Die Solubilisierung erfolgt bevorzugt in Gegenwart von reduzierenden Agenzien. Die unlöslichen Stoffe werden mittels bekannter Methoden abgetrennt. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß der Renaturierungsschritt in Gegenwart eines Stabilisierungsmittels (5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4(1H,3H)-pyrimidindion) durchgeführt werden kann.

Die Reinigung der Fusionsproteine kann mit Hilfe bekannter chromatographischer oder anderer biochemischer Methoden erfolgen.

Durch die molekularbiologische Einführung einer reaktiven Aminosäure, erfindungsgemäß bevorzugt eines Lysin- und/oder eines Cysteinrestes, gekoppelt an einen flexiblen Peptidlinker, wird eine kovalente Ankopplung von Molekülen auf chemischen Wege ermöglicht bzw. erleichtert. Die Kopplung kann erfindungsgemäß auf verschiedene Arten erfolgen. Als Beispiele sollen hier genannt werden: a) Bisimid-Ester sind in Wasser gut löslich und können unter milden Reaktionsbedingungen (pH 7,0 - pH 10,0) mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes reagieren. Die resultierende Amidbindung ist stabil. Auf diese Weise aktivierte Lumazinsynthasen können zur Kopplung mit anderen Peptiden verwendet werden. b) Carbodiimide gehören zu einer Verbindungsgruppe, die mit der allgemeinen Formel $R-N=C=N-R'$ zu beschreiben sind. R und R' können durch aliphatische oder aromatische Reste repräsentiert werden. Carbodiimide reagieren bevorzugt mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin. c) m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) ist ein gut untersuchtes heterobifunktionelles Reagenz. In neutraler wässriger Lösung reagiert MBS zunächst in einer Acylierungsreaktion mit Aminogruppen zum aktivierten N-hydroxysuccinimidester. Ein zweites Peptid kann dann mittels Addition eines Thiolrestes an die Doppelbindung des Esters gebunden werden. d) N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) ist ein heterobifunktionelles Reagenz, welches unter milden Bedingungen mit Aminogruppen des Zielproteins reagieren kann. Die 2-Pyridyldisulfid-Struktur kann dann mit aliphatischen Thiolen oder einem Cystein eines weiteren Peptids über eine Thiol-Disulfidaustauschreaktion reagieren. Die Kopplungsreaktion kann im pH-Bereich von 5-9 erfolgen und der Reaktionsfortschritt kann photometrisch verfolgt werden. Es sind keine Reaktionen mit anderen funktionellen Gruppen bekannt.

Die erfindungsgemäße Herstellung von *in vitro* reassozierten Lumazinsynthase-Konjugaten erfolgt über einen Dissoziationsschritt und einen nachfolgenden Faltungs/Reassoziationschritt. Die Dissoziation kann erfolgen durch Behandlung mit denaturierenden Agentien, z.B. Harnstoff oder Guanidinchlorid, durch Änderung des pH-Werts, durch Wärmebehandlung oder andere Verfahren. Die nach der Denaturierung monomer vorliegenden chimären Proteine setzen sich jeweils aus einer konstanten Region, einer Lumazinsynthase (bzw. einer modifizierten Lumazinsynthase) und einer variablen

Region (ein beliebiges fusioniertes Peptid) zusammen. Die monomeren Untereinheiten können anschließend beliebig gemischt werden. Da die rekombinierten Untereinheiten jeweils einen konstanten Lumazinsynthaseanteil besitzen, ist eine Renaturierung der Lumazinsynthase Kernstruktur unter Ausbildung der natürlichen ikosaedrischen Struktur möglich. Die Renaturierung kann dabei in Gegenwart eines Stabilisierungsmittels (bevorzugt 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4(1H,3H)-pyrimidindion) erfolgen.

Die *in vivo* Kombination von verschiedenen Lumazinsynthase-Varianten erfolgt auf dem Wege der Coexpression der jeweiligen Gene, die für das gewünschte Fusionspolypeptid kodieren. Die betreffenden Gene können sich hierbei auf der chromosomalen DNA des Wirtstammes und/oder auf einem oder mehreren Plasmidvektoren befinden. Durch eine Abstimmung der Expression der *in vivo* zu assoziierenden Lumazinsynthase-Varianten läßt sich ein bestimmtes Mischungsverhältnis, d.h. bestimmte Kombinations-Varianten einstellen.

In den Zeichnungen bedeuten:

Figur 1 eine schematische Darstellung eines ELISA-Protokolls zum Nachweis eines bestimmten Antigens oder eines bestimmten Antikörpers. Das Antigen ist an die Mikrotiterplatte gebunden. Das Enzym (E) ist an den sekundären Antikörper gekoppelt. Das farblose Substrat wird durch das Enzym (E) zu einem farbigen Produkt umgesetzt.

Figur 2 beschreibt die Detektion eines Antigens mittels eines biotinmarkierten primären Antikörpers. Ein Lumazinsynthase-Konjugat (verstärkendes Linkermolekül), welches bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält ist über eine Streptavidin- oder eine Avidinbrücke (SA) an den biotinylierten primären Antikörper gebunden. Die Farbreaktion wird durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym (E), welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung eines 60-fach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine extreme Signalverstärkung erreicht, wobei die Signalstärke proportional zur Antigenkonzentration ist.

Figur 3 beschreibt den Einsatz eines Lumazinsynthase-Mischkonjugates bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten.

A) Ein Lumazinsynthasemolekül, welches 1-5 kurze Peptide von antigen wirksamen viralen oder bakteriellen Oberflächenproteinen (antigene Determinanten) und bis zu 60

Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für immobilisierte Antikörper, die aus einem Patientenserum oder anderen Flüssigkeiten stammen.

B) Charakteristische Antikörper gegen bestimmte Infektionskrankheiten werden mit Hilfe spezieller immobilisierter Epitope (Teile von Oberflächenproteinen der betreffenden pathogenen Organismen; antigene Determinanten) aus der jeweiligen Körperflüssigkeit gefischt. Ein Lumazinsynthasemolekül, welches ebenfalls 1-5 Kopien des oben bezeichneten Epitops und bis zu 60 Biotinmoleküle kovalent gebunden enthält, dient als Detektionsmolekül für diese nun immobilisierten Antikörper.

Eine Farbreaktion wird in beiden Fällen durch ein beliebiges streptavidingekoppeltes Enzym (E), welches einen Komplex mit der biotinylierten Lumazinsynthase eingeht, erreicht. Durch die Zwischenschaltung eines mehrfach biotinylierten Linkerproteins (Lumazinsynthase-Konjugat) und der dadurch bedingten mehrfachen Bindung von farbreaktionvermittelndem Enzym, wird eine Signalverstärkung erreicht.

Nicht gebundene Antikörper werden in einem ersten Waschschrift entfernt. Erfolgt keine Bindung an die immobilisierten Epitope, so wird der Komplex aus Lumazinsynthase-Konjugat und Antikörper nicht gebildet. Überschüssiges Lumazinsynthase-Konjugat wird in einem zweiten Waschschrift entfernt, so daß der Testansatz farblos bleibt.

Figur 4 beschreibt eine schematische Darstellung einer Versuchsanordnung zur Reinigung von Antikörpern mit einer spezifischen Antigenerkennung. Ein Lumazinsynthase-Konjugat, das sowohl über ein gewünschtes Fremdpeptid (in mehrfacher Ausführung), als auch über einen biotinylierten Anteil (in einfacher Ausführung) verfügt, wird an über seinen Biotinanteil an immobilisiertes Streptavidin gebunden. Die Streptavidinmoleküle sind an eine feste Phase gekoppelt. Die Antikörpermischpopulation wird auf eine Säule mit immobilisiertem Streptavidin gegeben (oder mit Streptavidinmaterial gemischt), wobei die Antikörper mit der gewünschten Spezifität an den Fremdpeptidanteil auf dem Lumazinsynthase-Konjugat binden. Der Waschprozeß des Streptavidin-Lumazinsynthase-Konjugat-Antikörper-Komplex und die anschließende Elution der spezifischen Antikörper erfolgt durch bekannte Standardmethoden.

Figur 5 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Biosensors, der prinzipiell aus mindestens drei Teilen bestehen kann: 1. Der biologische Rezeptor, 2. Die Wandler-Einheit, 3. Die angegliederte Elektronik. Der biologische Rezeptor kann auf unterschiedliche Weise an den Wandler bzw. Transduktor gebunden vorliegen.

Figur 6 zeigt schematisch eine funktionalisierte Lumazinsynthase mit 60 gleichen bzw. unterschiedlich modifizierten Untereinheiten, die über einen Anker (Peptid, Fettsäure,

sonstige funktionelle Gruppen) mit einer Oberfläche (beispielsweise Wandleroberfläche, Membran, sonstige Oberflächen, etc.) verbunden ist. Die Detektionsempfindlichkeit für Fremdmolekülbindung auf der Oberfläche der Lumazinsynthase wird durch eine hohe Anzahl funktioneller Gruppen (beispielsweise Epitope zur Antikörpererkennung, Antikörper zur Detektion von Fremdmolekülen in Lösung oder sonstige Rezeptoren) erhöht.

Figur 7 zeigt schematisch einen möglichen Aufbau eines Feldeffekttransistors unter Einbeziehung einer multimeren, funktionalisierten Lumazinsynthase. Eine Veränderung der Oberflächenladung an der Torelektrode, die durch die Bindung eines Fremdmoleküls an die Oberfläche der Lumazinsynthase eintritt, moduliert dabei den Stromfluß durch den Feldeffekttransistor.

Figur 8 zeigt einen Sequenzvergleich von Lumazinsynthasen aus folgenden Organismen: 1. *Mycobacterium avium*; 2. *Mycobacterium tuberculosis*; 3. *Corynebacterium ammoniagenes*; 4. *Chlorobium tepidum*; 5. *Aquifex aeolicus*; 6. *Thermotoga maritima*; 7. *Bacillus subtilis*; 8. *Bacillus amyloliquefaciens*; 9. *A. pleuropneumoniae*; 10. *Streptococcus pneumoniae*; 11. *Staphylococcus aureus*; 12. *Vibrio cholerae*; 13. *Photobacterium phosphoreum*; 14. *S. putrefaciens*; 15. *Photobacterium leiognathi*; 16. *Shigella flexneri*; 17. *Escherichia coli*; 18. *Haemophilus influenzae*; 19. *Dehalospirillum multivorans*; 20. *Helicobacter pylori*; 21. *Deinococcus radiodurans*; 22. *Synechocystis sp.*; 23. *Porphyromonas gingivalis*; 24. *Arabidopsis thaliana*; 25. *Methanococcus jannaschii*; 26. *Archaeoglobus fulgidus*; 27. *Methanobacterium thermoautotrophicum*; 28. *Chlamydia trachomatis*; 29. *Saccharomyces cerevisiae*; 30. *Brucella abortus*. Die Proteinsequenzen wurden durch Übersetzung der zugrundeliegenden DNA-Sequenzen erhalten. Die gezeigte Sequenzmenge wurde erhalten durch Datenbanksuche unter Verwendung der Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997) und der Sequenz der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* als Suchmatrize.

Figur 9 zeigt die Aufsicht auf eine pentamere Untereinheit der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Der Ligand 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion bindet in der Kontaktstelle zwischen zwei monomeren Untereinheiten (Ladenstein et al., 1988, 1994; Ritsert et al., 1995).

Figur 10 zeigt ein Modell der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Eine von 12 pentameren Untereinheiten ist durch die Verwendung unterschiedlicher Grautöne hervorgehoben. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen an der Oberfläche und sind frei zugänglich.

Figur 11 zeigt die in den Ausführungsbeispielen verwendeten Expressionsvektoren. SD, ribosomale Bindungsstelle; MCS, Klonierungskassette mit singulären Schnittstellen; t_0 , t_1 , Terminatorsequenzen; (cat), nicht aktives Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (verschobener Leserahmen); (Δ cat), inaktives Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (Deletion); Restriktionsschnittstellen sind durch Buchstaben gekennzeichnet: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; N, NcoI; P, PstI; S, Sall. Translationsstart im Vektor pNCO113 bei Position 113 und an Position 233 bei p602/-CAT.

Figur 12 beschreibt die 1. PCR zur Einführung einer Mutation am Beispiel des Austausches der Aminosäure Cystein an Position 93 gegen Serin im Gen der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Im ersten Schritt der gerichteten Mutagenese werden zuerst zwei getrennte PCR-Ansätze, mit den Oligonukleotidpaarungen PNCO-M1/C93S und PNCO-M2/RibH-3 und dem Expressionsplasmid *pNCO-BS-LuSy* als Matrize, durchgeführt. Fragment A enthält die beabsichtigte Mutation und eine intakte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI. Fragment B repräsentiert das gesamte, aber unmutiert vorliegende ribH-Gen (Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*). In diesem Fragment ist die 5'-Klonierungsschnittstelle deletiert. (R: ribosomale Bindungsstelle)

Figur 13 beschreibt die 2. PCR bei der Einführung einer Mutation. Im zweiten Schritt der Mutagenese wird die eingeführte Mutation, die sich jetzt noch am Ende 3'-Ende des durch PCR generierten Gen-Fragmentes befindet, durch überlappende Verlängerung, in das gesamte Gen eingeführt.

Figur 14 beschreibt die 3. PCR zur Einführung einer Mutation. Die 3. PCR dient der Vermehrung des verlängerten Codonstranges von Fragment A.

In den Figuren 15 bis 24, 26 bis 28 und 30 und 31 ist die Sequenz der jeweils verwendeten Lumazinsynthase durch Fettdruck gekennzeichnet. Die Linkerregionen sind unterstrichen. Erkennungssequenzen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen sind kursiv und unterstrichen. Fusionierte Sequenzen, bzw. Aminosäuren, die nicht zur Linkersequenz gezählt werden, sind punktiert unterstrichen. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code angegeben.

Figur 15 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-N-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdproteinen an den N-Terminus der Lumazinsynthase.

Figur 16 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdproteinen an den C-Terminus der Lumazinsynthase.

Figur 17 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR*.

Figur 18 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-N-VP2-BS-LuSy* im Bereich des N-Terminus.

Figur 19 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-VP2-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 20 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 21 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-Lys165-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 22 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-Cys167-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 23 zeigt die Struktur des Vektors *pFLAG-MAC-BS-LuSy* im Bereich des N-Terminus.

Figur 24 zeigt die Struktur des Vektors *pNCO-C-His6-BS-LuSy* im Bereich des C-Terminus.

Figur 25 zeigt die Konstruktion der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (Deckert et al., 1998) unter Verwendung von 11 synthetischer Oligonukleotide (AQUI-1 bis AQUI-11) und einer 6-stufigen Polymerase-Kettenreaktion.

Figur 26 zeigt die Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. (Peptid ist über einen Linker mit 3 Alaninresten an den C-Terminus des Trägerproteins gebunden)

Figur 27 zeigt die Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

Figur 28 zeigt die Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus 6 Histidinresten und der Sequenz Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Ala an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

Figur 29 zeigt die Herstellung eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. (RBS: ribosomale Bindungsstelle)

Figur 30 zeigt den 5'-Bereich des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy* bzw. des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)* zur Fusion von Fremdgenen an das 5'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. Die neu in die Sequenz eingeführte Erkennungssequenz für die singuläre Restriktionsendonuklease BglII ist eingezeichnet.

Figur 31 zeigt den 3'-Bereich des Vektors *pNCO-AA-LuSy-(BamHI)* bzw. des Vektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)* zur Fusion von Fremdgenen an das 3'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*. An den C-Terminus des Trägerproteins ist ein Peptid mit der Sequenz GSVDLQPSLIS fusioniert.

Die angeführten DNA-Sequenzprotokolle erläutern den Aufbau, der in den Beispielen angeführten Plasmide. In den Sequenzprotokollen sind die Erkennungssequenzen der jeweiligen verwendeten Restriktionsendonukleasen kursiv und unterstrichen; die exprimierten Fusionsproteine sind jeweils fettgedruckt und Linkersequenzen sind punktiert unterstrichen; auf Ausnahmen in der Zeichenformatierung wird hingewiesen.

SEQ ID No.1 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO113*. (Vektor zur Expression von Genen in *Escherichia coli*; Stüber et al., 1990)

SEQ ID No.2 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *p602/-CAT*. (Schaukelvektor zur Expression von Genen in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*; Henner, 1990; LeGrice, 1990)

SEQ ID No.3 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid mit der unveränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* zur Expression in *Escherichia coli*)

SEQ ID No.4 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *p602-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid mit der unveränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* zur Expression in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*)

SEQ ID No.5 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C93S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an Position 93 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.6 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C139S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an Position 139 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.7 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsplasmides *pNCO-BS-LuSy-C93/139S*. (Expressionsplasmid mit einer veränderten Lumazinsynthase-Variante, wobei die Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 durch die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde)

SEQ ID No.8 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

SEQ ID No.9 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-BS-LuSy* zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*.

SEQ ID No.10 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei die Dihydrofolatreduktase an den N-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.11 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-EC-MBP-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus dem maltosebindenden Protein aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei das maltosebindende Protein an den N-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.12 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR*. Die Linkersequenz zwischen der Lumazinsynthase und der Dihydrofolatreduktase ist punktiert unterstrichen. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei die Dihydrofolatreduktase an den C-Terminus der Lumazinsynthase fusioniert vorliegt)

SEQ ID No.13 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne am N-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.14 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne am C-Terminus befindet)

SEQ ID No.15 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus der VP2-Domäne des 'Minc enteritis Virus' und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich die VP2-Domäne sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.16 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptid und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet)

SEQ ID No.17 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-Lys165-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression einer veränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, bei der der C-Terminus verlängert wurde und mit einem Lysinrest endet; das Codon für Lysin (AAA) ist unterstrichen)

SEQ ID No.18 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-Cys167-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression einer veränderten Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, bei der der C-Terminus verlängert wurde und mit einem Cysteinrest endet; das Codon für Cystein (TGC) ist unterstrichen)

SEQ ID No.19 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pFLAG-MAC-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 12 Aminosäuren langen Epitop, welches von einem monoklonalen Antikörper erkannt wird, und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am N-Terminus befindet; das ehemalige Startcodon der Lumazinsynthase ist unterstrichen)

SEQ ID No.20 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-His6-BS-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 6 Aminosäuren langen Peptid (6 x Histidin) und der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet; das Peptid ist unterstrichen)

SEQ ID No.21 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression der unveränderten, thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*; die DNA-Sequenz wurde an die Codon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasst; die DNA wurde vollsynthetisch hergestellt)

SEQ ID No.22 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-C-Biotag-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus einem 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptid und der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, wobei sich das fusionierte Peptid am C-Terminus befindet; das Peptid ist über einen Linker mit 3 Alaninresten mit dem C-Terminus des Trägerproteins verbunden)

SEQ ID No.23 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-His6-C-Biotag-AA-Lusy*. (Expressionsplasmid zur Expression der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-

terminal, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten gekoppeltem, *in vivo* biotinylierfähigem Peptid)

SEQ ID No.24 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-His6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-terminal, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurenfolge HHHHHHGGSGAAA gekoppeltem, *in vivo* biotinylierfähigem Peptid)

SEQ ID No.25 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy*. (Expressionsplasmid zur Expression eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*; der Anteil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* ist fettgedruckt, der Anteil der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist doppelt unterstrichen)

SEQ ID No.26 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-BglII-LuSy*. (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus bzw. an das 5'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BglII).

SEQ ID No.27 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-LuSy-(BamHI)* (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus bzw. an das 3'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BamHI)

SEQ ID No.28 zeigt die DNA-Sequenz des Expressionsvektors *pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)*. (Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N- und an den C-Terminus bzw. an das 5'- und an das 3'-Ende der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen BglII und BamHI)

Die verwendeten Bakterienstämme werden bei der DSM gemäß Budapester Vertrag hinterlegt. Die Hinterlegungsnummern werden nachgereicht.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

Die in den Ausführungsbeispielen verwendeten Stämme von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* sind im folgenden mit Genotyp und Literaturstelle aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Literatur
-------	---------	-----------

Bacillus subtilis Klonierstamm

BR151[pBL1]

trp. met. lys

Lovell, 1981

Escherichia coli Klonierstämme

XL1-Blue

recA1. endA1. gyrA96. thi-1. hsdR17. Bullock et al.,
supE44. relA1. lac[F', proAB. 1987
lacI^qZΔM15, Tn10(tet^r)

RR28

F', thi. pro. lac. gal. ara. mtl. xyl. Hennecke et al.,
supE44. endA. hsd(r', m'), pheS. recA 1982

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Eggenstein und MWG-Biotech, Ebersberg im Rahmen einer Auftragssynthese hergestellt.

Beispiel 1**Heterologe Expression des Gens der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* XL1**

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden RibH-1 (5' gag gag aaa tta acc atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle kodiert, und RibH-2 (5' tat tat gga tcc cca tgg tta ttc gaa aga acg gtt taa gtt tg 3'), welches am 3'-Ende zum Gen der Lumazinsynthase komplementär ist und hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease BamHI (G*GATCC) einführt, aus dem Plasmid pRF2 (Perkins et al., 1991), welches das gesamte RIB-Operon aus *Bacillus subtilis* enthält, amplifiziert (Mullis et al., 1986).

10 µl PCR-Puffer (75 mM Tris/HCl, pH 9.0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01 % (v/v) Tween 20)

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl RibH-1 [0,5 µM]

1 µl RibH-2 [0,5 µM]

1 µl pRF2 [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer)

bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,8 min 72 °C

5. 7,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

B) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Fragment mit einer Länge von 498 bp mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück

wurde gewogen und mit der 5-fachen Menge an 6 M NaJ-Lösung versetzt. Nach Aufschmelzen des Gelstückes wurde zu dieser Lösung Glasmilch (Geneclean II-Kit, Bio101; San Diego, CA) zugegeben (2 µl Glasmilch pro 1 µg DNA). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 8000 Umin⁻¹, 2 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Glasmilch mit 500 µl NEW-Waschlösung (Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) suspendiert, zentrifugiert (s.o.) und der Überstand anschließend vollständig entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl bidestilliertem Wasser (45 °C, 15 min). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte fluorometrisch unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid H 33258 (Höchst, Frankfurt). In Gegenwart von DNA liegt das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes bei 365 nm, das Emissionsmaximum bei 458 nm. Das verwendete Fluorometer arbeitet mit einer Quecksilberlampe und benutzt zur Anregung eine Wellenlänge von 365 nm in einer Bandbreite von 100 nm. Die Messung der Emission erfolgt mittels eines Photomultipliers bei 460 nm in einer Bandbreite von 10 nm. Die Nulleichung erfolgte mit 2 ml TNE-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 1 M NaCl), der 0,1 µg/ml Farbstoff enthielt. Anschließend wurden 2 µl eines Eichstandards mit bekannter DNA Konzentration (Plasmid-DNA) zugeben und diese Konzentration am Fluorometer eingestellt. Nachdem der Nullpunkt des Gerätes mit Puffer/Farbstoff-Lösung überprüft worden war, wurden 2 µl der DNA-Probe unbekannter Konzentration zugegeben und die Konzentration in µg/µl abgelesen.

- C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2. Polymerasekettenreaktion mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-1 (5' ata ata *gaa ttc* att aaa gag gag aaa tta acc atg 3'), welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI (G*AATTC) in das DNA-Fragment einführt, und RibH-2:

10 µl PCR-Puffer

6 µl Mg²⁺ [1.5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl EcoRI-RBS [0,5 µM]

1 µl RibH-2 [0,5 µM]

1 µl DNA aus der 1.PCR [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 5,0 min 95 °C
2. 0,5 min 94 °C
3. 0,5 min 50 °C
4. 0,8 min 72 °C
5. 7,0 min 72 °C
6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 30 x wiederholt.

D) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment mit einer Länge von 516 bp wie unter B) beschrieben gereinigt.

E) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut.

30,0 µl Fragment aus D)

2,5 µl EcoRI [62,5 U]

3,0 µl BamHI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x: 500 mM Kaliumacetat: 100 mM Magnesiumacetat: 100 mM Tris-Acetat, pH 7,5)

60,5 µl H₂O_{bidest}

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

F) Der Expressionsvektor pNCO113 wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut.

25,0 µl pNCO113 [5 µg]

2,5 µl EcoRI [62,5 U]

3,0 µl BamHI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x)

65,5 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 3387 bp wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

G) Ligation der DNA-Fragmente aus E) und F) in einem molaren Verhältnis von 3 : 1.
(Sgamarella, 1979)

1 µl Expressionsvektor aus F) [50 fmol]

2 µl DNA-Fragment aus E) [150 fmol]

4 µl H₂O_{bidest}

mischen, 10 min auf 55 °C erwärmen und dann 5 min auf Eis stellen

2 µl T₄-Puffer (5 x: 250 mM Tris/HCl, pH 7.6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25 % (w/v) Polyethylenglycol-8000)

1 µl T₄-Ligase [1 U] (Gibco BRL, Eggenstein)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und das Plasmid *pNCO-BS-LuSy* erhalten.

H) Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli* XL1-Zellen (Dower et al., 1988): 1 Liter LB-Medium wurde 1:100 mit einer bei 28 °C gewachsenen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5 bis 0,7 (frühe bis mittlere logarithmische Phase) bebrühtet. Die Bakterienkultur wurde zum Anhalten des Zellwachstums 15 min auf Eis gestellt und danach zur Gewinnung der Zellmasse zentrifugiert (Sorvall-GS-3-Rotor, 2300 U/min⁻¹, 4 °C, 15 min). Das Zellpellet wurde dann in 1 l eiskalter und steriler 10 %iger Glycerinlösung suspendiert und abermals zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrirte (500 ml 10 %ige Glycerinlösung; 20 ml 10 %ige Glycerinlösung) mit anschließender Zentrifugation. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 2-3 ml 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen und auf Eis gestellt. Elektroporationszelle und Küvettenhalter wurden 15 min auf Eis vorgekühlt. In einem vorgekühlten 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 40 µl der vorbereiteten Zellsuspension mit 1-2 µl des Ligationsansatzes aus G) vermischt und anschließend in die vorgekühlte Elektroporationszelle (0,1 cm) pipettiert. Die Elektroporation wurde bei 25 µF, 1,8 kV, 200 Ω (BioRad, München) durchgeführt, wobei die Zeitkonstante der Elektroporation bei 4-5 msec lag. Unmittelbar nach dem Elektroporationsvorgang wurde die Zellsuspension mit 1 ml SOC-Medium (2 % Pepton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose) versetzt und in ein steriles 10 ml Gefäß überführt. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen 1 h bei 37 °C im Schüttler bebrühtet und anschließend in 20 µl und 200 µl Portionen auf LB-Amp-Platten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt;

5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert und der Expressionsstamm XL1-*pNCO-BS-LuSy* erhalten.

I) Die Isolierung der Expressionsplasmide (*pNCO-BS-LuSy*) aus den unter H) erhaltenen Expressionsstämmen (XL1-*pNCO-BS-LuSy*) wurde nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Zellen aus einer 100 ml Übernacht-Kultur (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) wurden in 4 ml Puffer S1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg Rnase A/ml, pH 8.0) suspendiert und anschließend mit 4 ml Puffer S2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt. Nach vorsichtigem Umschwenken des Probengefäßes und einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit 4 ml Puffer S3 (2,6 M KAc, pH 5,2) versetzt, gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 17000 Umin⁻¹, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand unter Verwendung von Nucleobond®AX100 Säulen (Macherey und Nagel, Düren) gereinigt. Das Säulenmaterial wurde mit 2 ml Puffer N2 (0.9 M KCl; 100 mM Tris-Phosphat, pH 6,3; 15 % (v/v) Ethanol) äquilibriert und anschließend der Überstand aufgetragen. Nach Auswaschung von Verunreinigungen mit 8 ml Puffer N3 (1,3 M KCl, pH 6.3) wurde die DNA mit 2 ml Puffer N5 (1,3 M KCl, pH 8.0) eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNA mit 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt, 2x mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 200 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

J) Die Sequenzierung der Plasmid-DNA (*pNCO-BS-LuSy*) wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1971) mit markierten Terminatoren und Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA aus I), 10 pmol Sequenzieroligonukleotid Seq-1 (5' gtg agc gga taa caa ttt cac aca g 3'), 10 µl Terminator PremixTM (dNTP's, ddNTP's, markierte ddNTP's und Taq-DNA-Polymerase) von ABI (Weiterstadt) und wurde mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 21 µl aufgefüllt (lichtgeschützt durchgeführt, da markierte ddNTP's lichtempfindlich sind). Die Reaktion wurde in einer GeneAmpPCR System 2400 Maschine von Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA) mit folgendem Programm durchgeführt:

15 s/96 °C (Denaturierung der DNA)

15 s/50 °C (Annealing des Primers)

4 min/72 °C (Vermehrung der DNA)

Die Polymerasereaktion wurde 25 mal hintereinander durchgeführt.

Nach der Polymerase-Reaktion wurden 80 µl bidest. Wasser zum Ansatz gegeben und zweimal mit je 100 µl Phenol/Chloroform/Amylalkohol-Mischung (25:24:1) von ABI

(Weiterstadt) ausgeschüttelt, wobei die schwerere, rötlich gefärbte, Chloroform enthaltende Phase verworfen wurde. Das Ausfällen der DNA erfolgte mit 300 µl absolutem Ethanol in Anwesenheit von 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (Eppendorf-Rotor, 14000 Umin⁻¹, RT, 30 min) pelletiert, der Rückstand mit eiskalter 70 %iger Ethanol-Lösung gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in einer Mischung aus 1 µl 50 mM EDTA, pH 8,0 und 5 µl Formamid aufgenommen und zur Denaturierung der DNA 2 min auf 95 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gekühlt. 1,5 µl dieser Proben wurden dann auf ein 4,75 %iges Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen. Zur Erstellung des Sequenziergels wurden 13,3 ml UltraPureSequagelTMSequencing-System-Konzentrat von National Diagnostics (Atlanta, Georgia, USA) mit 49,7 ml UltraPureSequagelTMSequencing-System-Diluent vermischt und mit einer Spatelspitze von Amberlite MB-1 entionisiert. Die Suspension wurde anschließend filtriert (0,2 µm Filter) und 7 ml UltraPureSequagelTMSequencing-System-Puffer zugegeben. Nachdem 10 min unter Wasserstrahl-Vakuum entgast worden war, wurden 210 µl einer 10 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 25 µl TEMED zugegeben und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgte in TBE-Puffer (1 M Tris-Base, pH 8,3; 0,85 M Borsäure; 10 mM EDTA) in einem Zeitraum von 7 h auf einem PrismTM377-DNA-Sequencer von Perkin-Elmer-ABI (Weiterstadt).

K) Expressionsplasmide, die ein korrekt eingebautes Gen für die Lumazinsynthase enthielten wurden anschließend in LB-AMP-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 150 mg/l Ampicillin) kultiviert. Anzuchten wurden in einem Volumen von 25 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Es wurde zunächst eine Übernachtskultur (ca. 15 ml) Zellen aus H), welche aus einer Einzelkolonie stammten, angeimpft. Die Hauptkultur wurde 1:50 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft. Das Wachstum von Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gegen unbewachsenes Medium als Nullwert verfolgt. Die Expressionsstämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezogen und dann die Transkription des Lumazinsynthasegens mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in einer Konzentration von 2 mM induziert. Nach erfolgter Fermentation (nach Induktion weitere 5 h) wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min) geerntet, mit Saline gewaschen (20 % des Volumens der Hauptkultur; Saline: 0,9 % NaCl-Lsg.) und bei -20 °C bis zu einer weiteren Verwendung gelagert.

- L) Der Aufschluß der Zellen aus K) erfolgte unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 800 µl Aufschlußpuffer (50 mM K-Phosphat, pH 7,0; 10 mM EDTA; 10 mM Na₂SO₃; 0,3 mM PMSF; 0,02 % Natriumazid) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 8 sec mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 4,5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt und nochmals einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Eppendorff-Zentrifuge; 15000 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min) und der Überstand (Rohextrakt) zur weiteren Verarbeitung eingesetzt.
- M) Zur Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges (Lumazinsynthase), wurde eine denaturierende Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Routinemäßig wurden Gele mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 16 % Acrylamid im Trenngel angefertigt (Acrylamidstammlösung: 38,8 % (w/v) Acrylamid; 1,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid). Die Rohextrakte aus L) wurden 1:2; 1:5 oder 1:10 mit Protein-Auftragspuffer (20 % Glycerin; 4 % 2-Mercaptoethanol; 4 % (w/v) SDS; 0,05 % Bromphenolblau) verdünnt und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Proben in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 8 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente Dalton Mark VII-L von Sigma (Deisenhofen) mit Proteinbanden bei 66, 44, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa (Im Folgenden als Markerproteine bezeichnet). Die Elektrophorese wurde bei konstant 20 mV je SDS-Gel durchgeführt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte anschließend unter Verwendung von Coomassie-Färbelösung (40 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250). Zur Entfärbung des nicht mit Proteinmatrix versetzten Acrylamidgels wurde eine Coomassie-Entfärbelösung verwendet (40 % Methanol; 10 % Essigsäure (tech.); 50 % Wasser). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- N) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte unter Verwendung der natürlichen Substrate (5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion und L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat: Bacher et al., 1997). Der Ansatz enthielt

100 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0. 4 mM EDTA, 0,6 mM 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (PYR; hergestellt durch katalytische Hydrierung von 5-Nitro-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion), 2 mM DTT, 1 mM L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHP) und Rohextrakt aus L). Die Mischung wurde zuerst ohne PYR 3 min vorinkubiert und die Enzymreaktion dann durch Zugabe von PYR gestartet. Der Testansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Von der Mischung wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen (2, 5 und 10 min) Portionen entnommen, die Reaktion durch Zugabe von TCA (15 % in Wasser) abgestoppt und zentrifugiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, RT). Die Auswertung erfolgte mittels HPLC an der reversen Phase Nucleosil 10C₁₈ (4 x 250 mm). Die Konzentration des gebildeten 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazins wurde durch Fluoreszenzdetektion (Anregung: 407 nm; Emission: 487 nm) bestimmt. Der Elutionspuffer enthielt 7 % Methanol und 30 mM Ameisensäure. Als Standard diente chemisch synthetisiertes 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Eine Einheit (1 U) 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase katalysiert bei 37 °C die Bildung von 1 nmol 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin je Stunde. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy konnte eine Volumenaktivität von ca. 15600 U/ml gemessen werden. Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach O) (13 mg/ml) konnte eine spezifische Aktivität von ca. 1200 U/mg berechnet werden.

- O) Die Bestimmung des Proteins im Rohextrakt erfolgte nach einer Variante der Methode von Bradford (Read und Northcote, 1981; Compton und Jones, 1985). Das Farbstoffreagenz wurde durch Auffüllen von 0,1 g Serva Blue G, 100 ml 16 M Phosphorsäure und 47 ml
- P) Ethanol in Wasser gewonnen, filtriert und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Die Rohextrakte wurden mit einem Puffer, der 2,0 g Na₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄, 7,0 g NaCl und 0,2 g Natriumazid pro Liter Wasser enthielt, 50-fach verdünnt. Zu 50 µl dieser Lösung wurden 950 µl Reagenz gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe aus 50 µl Puffer auf 950 µl Reagenz bestimmt. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Ergebnisse wurden mittels einer mit BSA (Rinderserumalbumin) als Standard erhaltenen Eichgeraden in Proteinkonzentrationen umgerechnet.
- Q) Für die Negativkontrastierung wurden Trägernetzchen verwendet, die mit Formvar/Kohle beschichtet waren. Diese wurden jeweils vor der Verwendung neu beglimmt (vgl. Standardprotokolle zur Durchführung von Negativkontrastierung am Elektronenmikroskop). Etwa 10 µl Proteinlösung (≈ 1 mg/ml) wurden auf das Netzchen

gegeben. Der Teil, der nach 1 min noch nicht an das Trägermaterial adsorbiert war, wurde entfernt. Anschließend wurde die proteinhaltige Schicht mehrmals abwechselnd mit Uranylacetatlösung (2 % in Wasser) und bidest. Wasser benetzt. Der letzte Tropfen Uranylacetat wurde ca. 30 sec auf dem Präparat belassen. Abschließend wurde das Trägernetzchen mit Filterpapier getrocknet und in die Trägerapparatur des Elektronenmikroskops eingesetzt (Transmissions-Elektronenmikroskop JEM-100CX, Jeol, Japan). Negativkontrastierungen zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

- R) Die Western-Blot Analyse wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Ausgehend von einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (16 %) erfolgte die Übertragung der denaturierten Proteine über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Nach erfolgter Transformation der Proteine auf die Membrane, wurde diese kurz in Antikörper-Waschpuffer-A (20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM KCl; 0.05 % Tween 20) gewaschen und anschließend in Antikörper-Waschpuffer-B (mit 3 % Milchpulver) 1 Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran übernacht mit 10 µl Anti-sRFS (Kaninchen Rohserum mit polyklonalen Antikörpern gegen die Lumazinsynthase; 1:10 verdünnt in 1 mg/l BSA) in einem Gesamtvolumen von 5 ml Antikörper-Waschpuffer-C (mit 1 % Milchpulver) geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x mit je 5 ml Antikörper-Waschpuffer-A gewaschen. Die gespülte Membran wurde anschließend 1 Stunde mit 20 µl Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat (in 50 % Glycerin) in Antikörper-Waschpuffer-C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion von Lumazinsynthase enthaltenden Banden via Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (6 mg in 10 ml Antikörper-Waschpuffer-A) und 10 µl Wasserstoffperoxid (30 %ig). Nach Entwicklung der Membran konnte die Lumazinsynthase bei einem Molekulargewicht von ca. 16,2 kDa detektiert werden.
- S) Die Reinigung der Lumazinsynthase aus dem Stamm XL1-pNCO-BS-LuSy erfolgte in zwei Schritten: Der Kultivierung der *Escherichia coli* Zellen erfolgte nach K), jedoch in einem Volumen von 1 l. Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 32 ml Aufschlußpuffer suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dünbury, Connecticut) bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die aufgeschlossenen Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall

SS34-Rotor; 15000 Umin^{-1} ; 4°C) und der klare Überstand auf eine Anionenaustauschersäule (DEAE-Cellulose DE52; $2 \times 15 \text{ cm}$, Whatman Ltd., Maidstone, GB) aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 100 ml Puffer A (50 mM K-Phosphat, 10 mM EDTA, 10 mM Natriumsulfit, 0,02 % Natriumazid, pH 7,0) gespült und die Lumazinsynthase anschließend unter Durchführung eines Elutionsgradienten (101 ml bis 200 ml 15 % Puffer B; 201 ml bis 500 ml 18 % Puffer B; 501 ml bis 650 ml 100 % Puffer B) unter Einbeziehung von Puffer B (1M K-Phosphat, 10 mM EDTA, 10 mM Natriumsulfit, 0,02 % Natriumazid, pH 7,0) eluiert (Flußrate: 1 ml/min). Die Lumazinsynthase konnte bei ca. 250 mM K-Phosphat eluiert werden. Die Fraktionen wurden anschließend nach N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer A in einem Verhältnis 1:1000 dialysiert (18 h, 4°C). Das Dialysat wurde anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin^{-1} , 18 h, 4°C). Die zu ca. 75 % angereicherte konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Gel-filtrationssäule (Sephacrose-6B, $2 \times 180 \text{ cm}$, Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen und mit Puffer A eluiert (Flußrate: 0,5 ml/min). Die Lumazinsynthase eluierte kurz nach der Ausschlußgrenze. Die Fraktionen wurden anschließend nach N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet und anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin^{-1} , 18 h, 4°C). Die Reinheitsüberprüfung erfolgte nach M) (SDS-PAGE), wobei nur noch eine Proteinbande bei ca. 16 kDa zu beobachten war. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität nach N) und der Proteinkonzentration nach O) konnte eine spezifische Aktivität von 12400 U/mg berechnet werden. Negativkontrastierungen nach P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

T) Zur Überprüfung der Quartärstruktur des gereinigten Proteins wurde eine native Elektrophorese unter Verwendung von 3,5 %igen Polyacrylamidflachgelen durchgeführt. 5,7 ml Acrylamidstammmlösung (38,8 % (w/v) Acrylamid; 1,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid), 46 ml Gelpuffer (0,2 M Na-Phosphat, pH 7,2), 13 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 300 μl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10 % (w/v) in Wasser), 65 μl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 5 mg Bromphenolblau wurden gemischt und in einen Gelgießstand (Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung einer Trägerfolie (GelBond® PAG Film, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur

polymerisiert. Auf das Gel wurden 20 µl Proteinlösung in einer Konzentration von 0,2-1 mg/ml gegeben. Als Elektrodenpuffer wurde der Gelpuffer verwendet. Das Gel wurde bei konstant 100 mA unter Temperaturkontrolle (10 °C) entwickelt. Die Anfärbung bzw. Entfärbung erfolgte wie unter M) beschrieben. Die gereinigte Lumazinsynthase war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen und zeigte dasselbe Laufverhalten wie eine aus Wildtyp *Bacillus subtilis* gereinigte Probe.

- U) Zur Überprüfung der Quartärstruktur bzw. der Beurteilung der strukturellen Homogenität der gereinigten Lumazinsynthase wurde eine Sedimentationsanalyse an der analytischen Ultrazentrifuge (Optima XLA mit Rotor AN60 Ti, Beckman Instruments, München), durchgeführt (Laue et al., 1992). Zur Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde die Lumazinsynthase bei 45000 Umin⁻¹ zentrifugiert. Alle 5 min wurde die radiale Absorptionsänderung bei 280 nm gemessen und damit der Sedimentationsverlauf des Proteins verfolgt. Rekombinante Lumazinsynthase sedimentierte als homogene, symmetrische Grenzsicht, d.h. bei der Probe handelte es sich um eine einzige Molekülspezies. Aus dem zeitlichen Sedimentationsfortschritt während der einzelnen Messungen wurde eine mittlere Sedimentationskonstante $S_{20,w}$ von 26,3 S bestimmt.
- V) Die genaue Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Lumazinsynthase und die endgültige Bestätigung des Aggregationsgrades erfolgte mit der analytischen Ultrazentrifuge nach der Sedimentationsgleichgewichtsmethode. Die radiusabhängige Konzentrationsmessung erfolgte über die Messung der Absorption bei 280 nm. Die Proben waren konzentriertes Protein (nach Sepharose-6B), das auf SDS-Polyacrylamidgelen nur noch eine einzige Bande (16,2 kDa) zeigte. Die Absorption der verwendeten Proben betrug etwa 0,3 bei 280 nm. 150 µl Probe wurden in den Probensektor einer Meßzelle gegeben und mit 15 µl Öl (Fluorochemical FC 43, Beckman) unterschichtet. Der Referenzsektor wurde mit 200 µl Puffer A (siehe R)) befüllt. Die Enzymprobe wurde bei 3000 Umin⁻¹ und 4 °C solange zentrifugiert, bis sich das Gleichgewicht zwischen Zentrifugation und Rückdiffusion eingestellt hatte. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software XLA-Data-Analysis (Teilprogramm Origin-single; Beckman Instruments). Das partielle spezifische Volumen des Proteins wurde näherungsweise nach Cohn und Edsall (1943) aus den partiellen spezifischen Volumina der Aminosäuren und Addition einer Temperaturkorrektur errechnet. Für die Lumazinsynthase wurde eine Molekülmasse von 925 kDa bei 4 °C erhalten und damit die Aggregation zu einem 60-mer bestätigt.

Beispiel 2**Homologe Expression der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* im *Bacillus subtilis* Stamm BR151-pBL1**

Im Vergleich zur heterologen Expression in *Escherichia coli* kann bei der homologen Expression in *Bacillus subtilis* eine höhere Ausbeute an Lumazinsynthase erzielt werden.

- A) Analog Beispiel 1 A) - E), wobei anstelle des Oligonukleotids EcoRI-RBS-1 Oligonukleotid EcoRI-RBS-2 (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg 3') verwendet wurde.
- B) Der Expressionsvektor p602/-CAT wurde analog Beispiel 1 F) verdaut. Das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 5269 bp wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.
- C) Die Ligation erfolgte analog Beispiel 1 G), wobei das Expressionsplasmid p602-BS-LuSy erhalten wurde.
- D) Die Transformation von *Escherichia coli* XL1-Zellen erfolgte analog Beispiel 1 H), jedoch wurden anstelle LB-AMP-Platten, LB-KAN-Selektivagarplatten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Kanamycin) verwendet, da der Vektor p602/-CAT über eine Kanamycin-Resistenz anstelle der Ampicillin-Resistenz verfügt.
- E) Die Isolierung der Expressionsplasmide erfolgte analog Beispiel 1 I), jedoch wurden die Zellen auf LB-KAN-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Kanamycin) angezogen.
- F) Die Sequenzierung erfolgte analog Beispiel 1 J) jedoch mit Sequenzieroligonukleotid Seq-2 (5' gta taa tag att caa att gtg agc gg 3').
- G) Die Kultivierung der Expressionsstämme erfolgte analog Beispiel 1 K), jedoch unter Verwendung von LB-KAN-Flüssigmedium.
- H) Der Aufschluß der Zellen wurde analog Beispiel 1 L) durchgeführt.
- I) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des *Escherichia coli* Stammes XL1-p602-BS-LuSy (durchgeführt gemäß Beispiel 1 M)) zeigte eine diskrete Proteinbande bei ca. 16 kDa, die einer Expressionsrate von ca. 30 % bezogen auf die gesamte lösliche Proteinfraction entsprach.
- J) Die Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) und der Gesamtproteinkonzentration gemäß Beispiel 1 O) ergab eine spezifische Aktivität von ca. 3700 U/mg.

- K) Die Herstellung elektrokompeter *Bacillus subtilis* Zellen erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Brigidi et al. (1989). 500 ml LB-ERY-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin) wurden 1:100 mit einer *Bacillus subtilis* Zellen (BR151[pBL1]) enthaltenden Übernacht-Kultur angeimpft und bei 32 °C bis zu einer optischen Dichte (578 nm) von 0,6 bebrühtet. Zum Abstoppen des Zellwachstums wurden die Zellen 30 min auf Eis gestellt und anschließend zur Gewinnung der Zellmasse zentrifugiert (Sorvall-GSA-Rotor, 2300 Umin⁻¹, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 300 ml eiskaltem, sterilem 1 mM HEPES-Puffer (1 mM (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure in Wasser, pH 7,0) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in je 200 ml PEB-Puffer (272 mM Saccharose; 1 mM MgCl₂; 7 mM K-Phosphat, pH 7,4) gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde abschließend in 16 ml PEB-Puffer suspendiert und auf Eis gekühlt. Elektroporationszelle und Zellenhalter wurden 15 min auf Eis vorgekühlt. 800 µl Zellsuspension wurde in einem vorgekühlten Eppendorf-Gefäß mit 500-1500 ng Plasmid-DNA (p602-BS-LuSy aus E)) vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung der inkubierten Suspension in die Elektroporationszelle (4 mm) wurde die Elektroporation bei 25 µF und 2,5 kV in einer Elektroporationsapparatur (Gene Pulse, BioRad, München) durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zur Expression des Phänotyps (Kanamycin-Resistenz) wurden die transformierten Zellen in 6 ml LB-ERY-Medium (s.o.) pipettiert und 2 h bei 32 °C bebrühtet. Anschließend wurden 25 ml LB-ERY-KAN-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) mit 1 ml des Transformationsansatzes beimpft und für 4-8 h bei 32 °C im Schüttelinkubator bebrühtet. Parallel dazu wurden Portionen von 100 µl, 200 µl und 400 µl des Transformationsansatzes direkt auf LB-ERY-KAN-Selektivagarplatten (21 g/l Agar; 10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) ausplattiert. Portionen der Flüssigkultur wurden nach 2, 4, 6 und 8 h auf LB-ERY-KAN-Platten ausplattiert.
- L) Die erhaltenen *Bacillus subtilis* Stämme BR151-pBL1-p602-BS-LuSy wurden unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides getestet. Zur Analytik der Transformanden wurden jeweils PCR-Ansätze (vgl. Beispiel 1 A) jedoch ohne Matrizen-DNA und entsprechend mehr Wasser) vorgelegt und darin unter Verwendung von sterilen Zahnstochern frisches Zellmaterial (von den erhaltenen Kolonien) suspendiert. Nach erfolgter Suspendierung wurde eine Kopie der jeweiligen

Transformante auf einer LB-ERY-KAN-Selektivagarplatte angelegt. Bei allen getesteten Kolonien wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 498 bp erhalten.

- M) Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf LB-ERY-KAN-Flüssigmedium (10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 15 mg/l Erythromycin; 15 mg/ml Kanamycin) gemäß Beispiel 1 K), jedoch wurde die Fermentation bei 32 °C durchgeführt und die Wachstumsphase nach Induktion mit IPTG betrug 18 h.
- N) Der Aufschluß der Zellen erfolgte analog Beispiel 1 L).
- O) Die Überprüfung der Expressionsrate anhand einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte analog Beispiel 1 M) und ergab eine Expressionsrate von ca. 40 -50 % bezogen auf die gesamte lösliche Proteinfraction.
- P) Die Überprüfung der Funktionalität bzw. der Proteinkonzentration wurde gemäß Beispiel 1 N) und O) durchgeführt. Im Rohextrakt des Expressionsstammes BR151-pBL1-p602-BS-LuSy konnte eine spezifische Aktivität von 4000 U/mg gemessen werden.
- Q) Die Durchführung der Negativkontrastierung erfolgte nach Beispiel 1 P), wobei hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm zu beobachten waren.
- R) Die Western-Blot-Analyse wurde nach Beispiel 1 Q) durchgeführt und ergab ein vergleichbares Ergebnis.
- S) Da die Expressionsrate im verwendeten *Bacillus subtilis* Stamm BR151-pBL1-p602-BS-LuSy deutlich höher lag als im *Escherichia coli* Stamm XL1-pNCO-BS-LuSy konnte die Reinigung mit einer einzigen Säule (Sephacrose-6B, 2 x 180 cm, Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach M), jedoch in einem Volumen von 1l. Der Aufschluß erfolgte nach Beispiel 1 R) in 32 ml Aufschlußpuffer, jedoch wurden dem Aufschlußpuffer 30 mg Lysozym zugesetzt. Es erfolgte zunächst eine Inkubation der Zellsuspension (37 °C, 60 min) an die sich der Ultraschall-Aufschluß gemäß Beispiel 1 R) anschloß. Die aufgeschlossenen Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 4°C), filtriert (Porenweite 0,22 µm) und der klare Überstand auf eine mit Puffer A (gemäß Beispiel 1 R)) equilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit Puffer A eluiert (Flußrate: 0,5 ml/min). Die Lumazinsynthase wurde vom Säulenmaterial nicht retardiert. Die Fraktionen wurden anschließend nach Beispiel 1 N) auf Lumazinsynthaseaktivität getestet und anschließend unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman LE 70 mit Festwinkelrotor 70Ti; 32000 Umin⁻¹, 18 h, 4 °C). Die Reinheitsüberprüfung erfolgte nach Beispiel 1 M) (SDS-PAGE), wobei nur eine Pro-

teinbande bei ca. 16 kDa zu beobachten war. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität und der Proteinkonzentration (gemäß Beispiel 1 N) und O)) konnte eine spezifische Aktivität von 12400 U/mg berechnet werden. Negativkontrastierungen (gemäß Beispiel 1 P)) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

T) Die Überprüfung der Quartärstruktur der gereinigten Lumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 S) bis U) und ergab ein vergleichbares Ergebnis.

Beispiel 3

Ersatz der Aminosäure Cystein an der Positionen 93 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden PNCO-M2 (5' aga tat ttt cat taa aga gga gaa 3'), welches am 3'-Ende an einen Teil der ribosomalen Bindungsstelle bindet und am 5'-Ende einen nicht bindenden Sequenzabschnitt zur Deletion der vektoriellen EcoRI-Schnittstelle enthält und RibH-3 (5' tat tat gga tcc tta ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3') aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert.

10 µl PCR-Puffer

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl PNCO-M2 [0,5 µM]

1 µl RibH-3 [0,5 µM]

1 µl pNCO-BS-LuSy [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer)

bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,5 min 72 °C

5. 7,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein Fragment mit 505 bp erhalten wurde.
- C) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden PNCO-M1 (5' gtg agc gga taa caa ttt cac aca g 3'), welches im Bereich der EcoRI-Schnittstelle im Expressionsvektor bindet und diese Erkennungssequenz unberührt läßt und C93S (5' gca gct tca ttc gaa aca taa tcg taa tg 3'), welches die Mutation und die Schnittstelle *BstBI* (aminosäurenkonservativ) zur Detektion der Mutation einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR und die Reinigung des Fragmentes (256 bp) erfolgte analog A) und B).
- D) Verlängerung des DNA-Fragmentes (256 bp) aus C) durch Kombination mit DNA-Fragment (505 bp, repräsentiert die gesamte Genlänge) aus B) und Durchführung einer PCR. Bei diesem PCR-Ansatz dienen die eingesetzten PCR-Fragmente aus B) und C) selbst als Primer für die Polymerasereaktion. Um eine effiziente Verlängerung zu erreichen wurden beide Fragmente in äquimolaren Mengen (je 500 fmol) eingesetzt.

10 µl Puffer

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl DNA-Fragment aus B) (500 fmol)

1 µl DNA-Fragment aus C) (500 fmol)

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U]

73 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer)

bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 65 °C

4. 0,5 min 72 °C

5. 7,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

- E) Eine ungereinigte Portion des PCR-Ansatzes aus D) diente als DNA-Matrize für einen PCR-Ansatz mit der Primerkombination PNCO-M1/RibH-3. Der PCR-Ansatz wurde gemäß A) durchgeführt, wobei jedoch die PCR-Schritte 25 x wiederholt wurden.
- F) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein Fragment mit 528 bp erhalten wurde.
- G) Die Weiterverarbeitung erfolgte gemäß Beispiel 1 E) bis I). Die eingeführte Mutation wurde durch Verdau des Plasmids pNCO-BS-LuSy-C93S mit der Restriktionsendonuklease BstBI (TT*CGAA) diagnostiziert (Fragmente mit 3698 bp und 181 bp).
- H) Die Sequenzierung erfolgte gemäß Beispiel 1 J).
- I) Proteinchemische Arbeiten wurden gemäß Beispiel 1 K) bis S) durchgeführt, wobei kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Lumazinsynthese erkennbar wurde.

Beispiel 4

Ersatz der Aminosäure Cystein an der Positionen 139 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis* wurde analog Beispiel 3 A) mit den Oligonukleotiden PNCO-M2 und RibH-3 aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert und gereinigt.
- B) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis* wurde analog Beispiel 3 B) mit den Oligonukleotiden PNCO-M1 und C139S (5' ggc aga aac agc tga atc tac acc ttt gtt g 3'), welches die Mutation und die Schnittstelle PvuII (aminosäurenkonservativ) zur Detektion der Mutation einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR und die Reinigung des Fragmentes (394 bp) erfolgte analog Beispiel 3 A) und B).
- C) Das weitere molekularbiologische Vorgehen entsprach Beispiel 3 D) bis H). Die eingeführte Mutation wurde durch Verdau des Plasmids pNCO-BS-LuSy-C139S mit der Restriktionsendonuklease PvuII (CAG*CTG) diagnostiziert (Fragmente mit 3539 bp und 340 bp).
- D) Das weitere biochemische Vorgehen entsprach Beispiel 1 K) bis S) wobei kein signifikanter Unterschied zur Wildtyp-Lumazinsynthese erkennbar wurde.

Beispiel 5

Ersatz der Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 durch die Aminosäure Serin in der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Der Herstellung der Doppelmutante pNCO-BS-LuSy-C93/139S erfolgte analog zu Beispiel 4, jedoch wurde als DNA-Matrize das Plasmid pNCO-BS-LuSy-C93S verwendet.
- B) Nach erfolgter biochemischer Charakterisierung (gemäß Beispiel 1 K) bis S)) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym festgestellt werden.

Konstruktion von Expressionsvektoren zur N-terminalen und C-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Herstellung von *Escherichia coli* Expressionsvektoren zur Fusion von Genen oder synthetisch hergestellter DNA-Fragmenten an das 5'-Ende bzw. an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*. Die Vektoren enthalten die erfindungsgemäß bevorzugten Vektorelemente, wie Promotor aus dem Bakteriophagen T5, eine lac-Operatorsequenz, einen Ampicillinresistenzmarker und einen zu *Escherichia coli* kompatiblen Replikationsursprung.

Beispiel 6

Vektor zur Fusion von Fremd-DNA an das 5'-Ende des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden N1 (5' act atg gcg gcg gcg cgt agc tgc gcg gcc gct atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches eine NotI-Schnittstelle unmittelbar vor dem Startcodon erzeugt und RibH-4 (3' tat tat gga tcc aaa tta ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3') aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.
- B) Die Reinigung erfolgte analog Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit 513 bp erhalten wurde.
- C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2. PCR mit den Oligonukleotiden N2 (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg gcg gcg gcg cgt agc tgc 3'), welches in 5'-Richtung eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Endonuklease EcoRI einführt, und RibH-4.
- D) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis J). Es wird das Plasmid pNCO-N-BS-LuSy erhalten.

Beispiel 7**Vektor zur Fusion von Fremd-DNA an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis***

- A) Das Gen für die Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (vgl. Beispiel 2 A)) und C2 (5' ttt tct gga tcc ttt taa act gtt tgc ggc cgc taa ttc aaa tga gcg gtt taa att tg 3'), welches eine NotI-Schnittstelle hinter dem letzten kodierenden Basentriplett des Gens für die Lumazinsynthese und in 3'-Richtung eine BamHI-Schnittstelle im Abstand von 13 Nukleotiden einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (vgl. Beispiel 1) amplifiziert. Das ehemalige Stopcodon des Lumazinsynthese-Gens wird durch das für die Aminosäure Leucin kodierende Basentriplett TTA ersetzt.
- B) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis J). Es wird das Plasmid pNCO-C-BS-LuSy erhalten.

Fusion von vollständigen Proteinen an den N-Terminus bzw. an den C-Terminus der Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Fusion eines intakten vollständigen Gens an das 5'-Ende bzw. an das 3'-Ende des Gens für die Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis*. Die Beispiele illustrieren die Durchführbarkeit der Fusion von vollständigen, biologisch aktiven Proteinen an den N-Terminus als auch an den C-Terminus der ikosaedrischen Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis*.

Beispiel 8**Fusion der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* an den N-Terminus der Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis***

- A) Das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurde mittels PCR aus isolierter chromosomaler-DNA (*Escherichia coli* RR28) unter Verwendung der Oligonukleotide EC-DHFR-1 (5' gag gag aaa tta act atg atc agt ctg att gcg g 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des DHFR-Gens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle kodiert, und EC-DHFR-2 (5' cta gcc gta aat tct ata gcg gcc gca cgc cgc tcc aga atc 3'), welches am 3'-Ende zum Gen der DHFR komplementär ist und unmittelbar hinter dem letzten codierenden Basentriplett eine Erkennungssequenz für die Endonuklease NotI einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A), wobei ca. 50 ng chromosomale DNA eingesetzt wurde.

- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 513 bp erhalten wurde.
- C) Die Durchführung einer zweiten PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination BS-MfeI (5' ata ata *caa ttg* att aaa gag gag aaa tta act atg 3'), welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease MfeI in das DNA-Fragment einführt, und EC-DHFR-2 verwendet wurde.
- D) Der PCR-Ansatz wurde wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt, wobei ein Fragment mit einer Länge von 531 bp erhalten wurde.
- E) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen MfeI verdaut.
- 30,0 µl Fragment aus der 2. PCR
- 5,0 µl MfeI [50 U]
- 10,0 µl Puffer 4 (10 x; 50 mM K-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9)
- 55,0 µl H₂O_{bidest}
- Das Restriktionsenzym wurde von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease NotI eingesetzt.
- F) Das gereinigte DNA-Fragment aus E) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI verdaut.
- 30,0 µl Fragment aus E)
- 5,0 µl NotI [50 U]
- 10,0 µl Puffer 3 (10 x; 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9)
- 55,0 µl H₂O_{bidest}
- Das Restriktionsenzym wurde von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.
- G) 5 µg des Expressionsvektors pNCO-N-BS-LuSy in einem Volumen von 30 µl wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease NotI analog F) verdaut und gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.
- H) Das Vektorfragment aus G) wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut.

30,0 µl Vektor-Fragment aus G

2,5 µl EcoRI [62,5 U]

20,0 µl OPAU (10 x: 500 mM K-Acetat, 100 mM Mg-Acetat, 100 mM Tris-Acetat pH 7,5)

47,5 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 150 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment mit einer Länge von 3863 bp wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

- I) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).
- J) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 34,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-EC-DHFR-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 40-50 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- K) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.
- L) Die Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) an einer Sepharose-6B-Gelfiltrationssäule, wobei die Konzentrierung der Proteinfractionen bei 28000 Umin⁻¹ durchgeführt wurde. Negativkontrastierung gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 20 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- M) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur Wildtyp-Lumazinsynthase konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-DHFR-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer, bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Beispiel 9

Fusion des 'Maltose-bindenden-Proteins' aus *Escherichia coli* an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für das „Maltose-bindende-Protein“ (MBP) wurde mittels PCR aus dem Plasmid pMAL-C2 (New England Biolabs, Schwalbach) unter Verwendung der Oligonukleotide MALE-1 (5' gag gag aaa tta act atg aaa atc gaa gaa ggt aaa c 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des MBP-Gens komplementär ist und am 5'-Ende für einen Teil einer optimierten

ribosomalen Bindungsstelle kodiert, und MALE-2 (5' gca ggt cga ctc tag cgg ccg cga att ctg 3'), welches am 3'-Ende zum Gen des MBP komplementär ist und unmittelbar hinter dem letzten codierenden Basentriplett eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *NotI* einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A), wobei ca. 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1210 bp erhalten wurde.
- C) Die Durchführung einer zweiten PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination BS-MfeI (5' ata ata caa ttg att aaa gag gag aaa tta act atg 3'), welches die ribosomale Bindungsstelle vervollständigt und unmittelbar vor der ribosomalen Bindungsstelle eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *MfeI* in das DNA-Fragment einführt, und MALE-2 verwendet wurde.
- D) Der PCR-Ansatz wurde wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt, wobei ein Fragment mit einer Länge von 1227 bp erhalten wurde.
- E) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 8 E) bis I).
- F) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-EC-MBP-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 59,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-EC-MBP-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 50 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- G) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.
- H) Die Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) an einer Sepharose-6B-Gelfiltrationssäule, wobei die Konzentrierung der Proteinfractionen bei 28000 Umin⁻¹ durchgeführt wurde. Negativkontrastierung gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 25 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- I) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur BS-LuSy und EC-DHFR-BS-LuSy konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-MBP-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer als BS-LuSy und EC-DHFR-BS-LuSy bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Beispiel 10**Fusion der Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli* an den C-Terminus der Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis***

- A) Das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurde mittels PCR aus isolierter chromosomaler-DNA (*Escherichia coli* RR28) unter Verwendung der Oligonukleotide Oligonukleotide EC-FolA-1 (5' ata gtg gcg aca atg cgg ccg ctg gtg gag gcg gaa tga tca gtc tga ttg cgg cg 3'), welches am 3'-Ende zum 5'-Ende des DHFR-Gens komplementär ist und am 5'-Ende unmittelbar vor dem Startcodon des DHFR-Gens eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI einführt und EC-FolA-2 (5' ttc tat gga tcc tta ccg ccg ctc cag aat c 3'), welches am 3'-Ende zum Gen der DHFR komplementär ist und unmittelbar hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease *BamHI* einführt, amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A), wobei ca. 50 ng chromosomale DNA eingesetzt wurde.
- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 524 bp erhalten wurde.
- C) Das isolierte DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonukleasen *BamHI* verdaut.
- 30,0 µl Fragment aus der 2.PCR
3,0 µl *BamHI* [60 U]
20,0 µl OPAU (10x)
47,0 µl H₂O_{bdest}
- Das Restriktionsenzym wurde von der Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Der Ansatz wurde 150 min bei 37 °C inkubiert und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease NotI eingesetzt.
- D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* gemäß Beispiel 8 F) verdaut und wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.
- E) 5 µg des Expressionsvektors pNCO-C-BS-LuSy in einem Volumen von 30 µl wurden zunächst gemäß C) und D) verdaut, wobei ein Fragment mit einer Länge von 3880 bp entstanden ist, gemäß Beispiel 1 B) gereinigt und zur Ligation eingesetzt.
- I) Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).
- J) Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde gemäß Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 34,8 kDa beobachtet werden, die in einem Ver-

gleichsstamm ohne pNCO-BS-LuSy-EC-DHFR-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 25 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

- K) Die Überprüfung der Funktionalität der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase erfolgte gemäß Beispiel 1 N) in Verbindung mit O). Im Rohextrakt konnte kein signifikanter Unterschied zu einer nicht-derivatisierten Wildtyp-Lumazinsynthase beobachtet werden.
- L) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S). Im Vergleich zur Wildtyp-Lumazinsynthase konnte ein deutlicher Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit (EC-DHFR-BS-LuSy wanderte deutlich langsamer, bildete aber auch eine diskrete Bande) beobachtet werden.

Kopplung eines 17 Aminosäuren langen Epitops des VP2 Oberflächenproteins eines Säugetiervirus an den N-Terminus, an den C-Terminus und an beide Termini der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

Die folgenden Beispiele beschreiben die Fusion von kurzen Peptiden an beide Termini der ikosaedrischen Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* unter Erhalt der sphärischen Struktur. Durch die gleichzeitige Belegung beider Termini wird eine 120-fache Belegung der Oberfläche des Ikosaeders ermöglicht.

Das 17 Aminosäuren lange Peptid zählt zu den hochkonservierten Bereichen des VP2 Oberflächenproteins von verschiedenen tierischen Virusarten, wie z.B. des 'Mink enteritis Virus', des 'Feline panleukopeniavirus' oder des 'Canine Parvovirus'.

Beispiel 11

Fusion der VP2-Domäne an den N-Terminus der Lumazinsynthase

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden N-VP2-1 (5' ggt cag ccg gct gtt cgt aac gaa cgt atg aat atc ata caa gga aat tta gtt ggt ac 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens und am 3'-Ende für einen Teil der VP2-Domäne kodiert und RibH-3 (siehe Beispiel 3 A)) aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1 A)) amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß Beispiel 1 A).
- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 504 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.

- C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination N-VP2-2 (5' gag gag aaa tta act atg ggg gac ggt gct gtt cag ccg gac ggt ggt cag ccg gct gtt cgt aac gaa cg 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zu dem schon eingeführten Teil der VP2-Domäne ist, die VP2-Domäne vervollständigt, ein ATG-Startcodon und einen Teil einer optimierten ribosomalen Bindungsstelle unmittelbar vor der VP2-Sequenz einführt, und RibH-3 verwendet wurden.
- D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 549 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 3. PCR eingesetzt.
- E) Die Durchführung der 3. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), jedoch mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und RibH-3.
- F) Der PCR-Ansatz aus E) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 567 bp erhalten.
- G) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-N-VP2-BS-LuSy erhalten wurde.
- H) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-N-VP2-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,2 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-N-VP2-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca.
- I) 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- J) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 12

Fusion der VP2-Domäne an den C-Terminus der Lumazinsynthase

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden RibH-1 (siehe Beispiel 1 A)) und C-VP2-1 (5' cca ccg tcc ggc tga aca gca ccg tca cct tcg aaa gaa cgg ttt aag ttt gcc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase einen Teil der VP2-Domäne einführt, aus dem Plasmid pRF2 (siehe Beispiel 1 A)) amplifiziert.

- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 506 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.
- C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-VP2-2 (5' ata tat gga tcc taa cgt tgg tta cga aca gcc ggc tga cca ccg tcc ggc tga aca gca ccg tc 3'), welches die VP2-Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der VP2-Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.
- D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 564 bp erhalten.
- E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-C-VP2-BS-LuSy* erhalten wurde.
- F) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-*pNCO-C-VP2-BS-LuSy* konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,1 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne *pNCO-C-VP2-BS-LuSy*-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- G) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 13

Fusion der VP2-Domäne an den N- und an den C-Terminus der Lumazinsynthase

- A) Ausgehend von dem in Beispiel 11 erhaltenen Expressionsplasmid *pNCO-N-VP2-BS-LuSy*, welches die VP2-Domäne an das 5'-Ende des Lumazinsynthasegens fusioniert enthält, wurde analog Beispiel 12 die VP2 Domäne an das 3'-Ende des Lumazinsynthasegens fusioniert.
- B) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-*pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy* konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne *pNCO-N/C-VP2-BS-LuSy*-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca.

- C) 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- D) Nach Überprüfung der Funktionalität gemäß Beispiel 1 N) bis Q) konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.

Beispiel 14

Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, *in vivo* biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-Biotag-1 (5' cat agc ttc gaa gat gcc gcc gag tgc ggc cgc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase, DNA für einen Linker, bestehend aus 3 Alaninresten und einen Teil der DNA kodierend für das biotinylierfähige Peptid einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).
- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 528 bp erhalten wurde, gereinigt und als DNA-Matrize für eine 2. PCR eingesetzt.
- C) Die Durchführung der 2. PCR erfolgte analog Beispiel 1 C), wobei jedoch die Oligonukleotid-Kombination EcoRI-RBS-2 und C-Biotag-2 (5' tat tat gga tcc tta gcg cca ctc cat ctt cat agc ttc gaa gat gcc gcc gag tgc ggc 3'), welches die biotinylierfähige Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett dieser Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.
- D) Der PCR-Ansatz aus C) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 558 bp erhalten.
- E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy erhalten wurde.
- F) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthase gemäß Beispiel 1 N) konnte nur eine enzymatische Aktivität, die der Aktivität des *Escherichia coli* Stammes XL1 entsprach, ermittelt werden.
- G) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy

konnte keine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-Biotag-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war.

- H) Zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes wurden die Zellen analog Beispiel 1 K) kultiviert. 1/12 der gewonnenen Zellmasse wurde mit 300 µl Proteinauftragspuffer (siehe Beispiel 1 M)) suspendiert und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Proben in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 8 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog Beispiel 1 M). Es zeigte sich in Verbindung mit G), daß der Stamm XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy rekombinantes Protein in Form von unlöslichen Einschlußkörpern in einer Menge von ca. 15 % bezogen auf alle zellulären Proteine (lösliche und unlösliche Proteine, abgeschätzt vom SDS-PAGE) liefert.
- I) Zum Nachweis des Lumazinsynthaseanteils im artefiziellen Lumazinsynthase-Fusionsprotein wurde eine Western-Blot Analyse analog Beispiel 1 Q), wobei jedoch zusätzlich zur löslichen Proteinfraction auch die Gesamtproteinfraction analysiert wurde, durchgeführt. Nach Entwicklung der Membran konnte rekombinantes Lumazinsynthase-Fusionsprotein nur in der Gesamtproteinfraction, jedoch nur zu einem vernachlässigbaren Anteil in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden.
- J) Zum Nachweis der Biotinylierung wurden sowohl die lösliche Proteinfraction, als auch die Gesamtproteinfraction auf eine Membran übertragen. Ausgehend von einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (16 %) erfolgte die Übertragung der denaturierten Proteine über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Nach erfolgter Transformation der Proteine auf die Membrane, wurde diese kurz in Antikörper-Waschpuffer-A (siehe Beispiel 1 Q)) gewaschen und anschließend in Antikörper-Waschpuffer-B 1 Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran übernacht mit 20 µl Streptavidin gekoppelt an 'alkalische Phosphatase' (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in einem Gesamtvolumen von 15 ml Antikörper-Waschpuffer-C geschwenkt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x mit je 5 ml Antikörper-Waschpuffer-A gewaschen. Nach erfolgtem Waschen erfolgte die Detektion des Biotin-gebundenen Streptavidins via Zugabe der Substrate für die Alkalische Phosphatase. 50 µl BCIP-Stammlösung (25 mg 5-Brom-4-Chlor-indol-3-yl-phosphat in 500 µl Dimethylformamid lösen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren) und 100 µl NBT-Stammlösung (50 mg Nitroblautetrazoliumchlorid in 700 µl

Dimethylformamid und 300 µl Wasser lösen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren) werden in 15 ml Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) verdünnt. Nach Entwicklung der Membran in dieser Lösung konnte im Gesamtproteinextrakt rekombinantes, biotinyliertes Protein bei einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa in Form einer blauen Bande, detektiert werden. Gesamtprotein aus dem *Escherichia coli* Stamm XL1 ohne das Plasmid *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* wies keine diesbezügliche Färbung auf. Nach erfolgter Anfärbung wurde die Membran in Wasser gewaschen und 5 min in einem Stop-Puffer (20 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA-Na₂, pH 8,0) inkubiert.

- K) Zur Renaturierung des unlöslichen biotinylierten Lumazinsynthase-Fusionsproteins wurden zunächst die löslichen Proteinfractionen gemäß Beispiel 1 L) abgetrennt.
- L) Der unlösliche Rückstand aus K) wurde in 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, der 6 M Harnstoff, 6 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion und 100 mM Dithiothreitol (DTE) enthielt, während 24 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur solubilisiert. Die entstandene Proteinlösung wurde anschließend zweimal gegen das 10-fache Volumen 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, der 1 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion und 1 mM DTE enthielt, jeweils 12 Stunden bei 4 °C dialysiert. Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 4 °C) wurde das im Überstand enthaltene Protein unter Verwendung einer Ultrazentrifuge konzentriert (Beckman TFT 70-Rotor; 32000 Umin⁻¹; 16 h; 4 °C). Die Analytik des renaturierten Proteins erfolgte gemäß den Ausführungen J), Beispiel 1 S) und Beispiel 1 P). Mit der oben beschriebenen Maßnahme konnte renaturiertes, ikosaedrisches, aus 60 Untereinheiten bestehendes Fusionsprotein erhalten werden.
- M) Der Nachweis der Zugänglichkeit der Biotinmoleküle im nativen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). 100 µl einer Avidin-Stammlösung (Sigma, München) mit der Konzentration 1 mg/ml wurden zunächst in 20 ml Beschichtungspuffer (20 mM Na-Carbonat, pH 9,6) verdünnt (Standardlösung). Jeweils 100 µl der Standardlösung wurden in die Probestaschen der Mikrotiterplatte pipettiert, die Probestaschen anschließend mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend abgegossen und jeder Napf 3 mal mit je 200 µl PBS (20 mM Na-Phosphat, 130 mM NaCl, pH 7,2) gewaschen. Die nicht mit Avidin bedeckte Kunststoffoberfläche der Probestasche wurde mit je 350 µl Abdecklösung (3 % Milchpulver in PBS) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die

Abdecklösung wurde anschließend abgegossen und die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft. In die 1. von 8 Probestaschen wurde anschließend 100 µl der renaturierten Probenlösung aus L) (ca. 1 mg/ml) gegeben. In die Probestaschen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probestasche wurde freigelassen. 50 µl aus Probestasche 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probestasche 2 verdünnt (10 x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probestasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probestasche 3 verdünnt, etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probestasche 7 verworfen, so daß nun alle Probestaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Probenlösungen wurden anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probestaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 15 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in 20 ml Verdünnungslösung verdünnt (Detektionslösung). Jeweils 100 µl Detektionslösung wurden in die Probestaschen 1 - 8 pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Detektionslösungen wurden anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probestaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (10 mg p-Nitrophenylphosphat in 10 ml Färbepuffer (siehe J)) für die Alkalische Phosphatase und Messung der Extinktion bei 405 nm. Da es sich bei der Lumazinsynthase um ein sphärisches Molekül handelt, liegen die Biotinmoleküle statistisch auf der Oberfläche verteilt vor. Befinden sich zu viele biotinylierte Lumazinsynthasemoleküle auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte (über Avidin an die Mikrotiterplatte gebunden), so sind die seitlichen Biotinmoleküle für eine Bindung an Streptavidin nicht mehr zugänglich. Erst nach Verringerung der Konzentration der biotinylierten Lumazinsynthasemoleküle werden die seitlichen Biotinmoleküle für eine Bindung an Streptavidin zugänglich, d.h. die Signalstärke steigt an.

Markierung des C-terminalen Endes der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit einer reaktiven Aminosäure

Die folgenden Beispiele beschreiben die Einführung von reaktiven Aminosäuren (Lysin und Cystein) am C-Terminus der Lumazinsynthase. Auf der Oberfläche der Lumazinsynthase sind

zwar basische Aminosäuren, die sich eventuell für eine kovalente Kopplung von chemischen Molekülen eignen vorhanden, ihre Zugänglichkeit ist jedoch durch benachbarte Aminosäurereste eingeschränkt. Auf der Oberfläche der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* befinden sich keine freien Cysteinreste die sich, aufgrund ihrer Thiolgruppe für eine kovalente Kopplung von chemischen Molekülen eignen könnten.

Zur Verbesserung der Zugänglichkeit, bzw. zur Minimierung der sterischen Hinderung wurde ein Linker (Tentakel-Linker) zwischen dem C-Terminus der Lumazinsynthase und der betreffenden Aminosäure eingeführt, so daß die reaktiven Aminosäuren für nahezu jede chemische Kopplung mit Fremdmolekülen zugänglich werden.

Beispiel 15**Verlängerung des C-Terminus und Einführung einer terminalen basischen Aminosäure (Lysin) als Grundlage zur chemischen Kopplung von Zielmolekülen**

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und C-Lys165 (5' tat tat gga tcc tta ttt acc aga gcc acc acc aga acc acc gcc acc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase ein Gen, kodierend für das Peptid (Gly)₄Ser-(Gly)₃Ser-Gly-Lys, einführt, aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy amplifiziert. Unmittelbar hinter dem Codon für Lysin (aaa) an der Aminosäurenposition 165 wird mit dem Oligonukleotid C-Lys165 ein Stopcodon und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* in die DNA-Sequenz eingeführt. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.
- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 543 bp erhalten wurde.
- C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-Lys165-BS-LuSy* erhalten.
- D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-Lys165-BS-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-Lys165-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 1 N) bis Q) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (BS-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 16**Verlängerung und Einführung eines terminalen Cysteinrestes an den C-Terminus der Lumazinsynthase als Grundlage zur chemischen Kopplung von Zielmolekülen**

- A) Die Konstruktion erfolgte analog Beispiel 15 A) bis C), jedoch wurde anstelle des Oligonukleotids C-Lys165 das Oligonukleotid C-Cys167 (5' tat tat gga tcc tta gca gcc acc acc aga gcc acc acc aga acc acc gcc acc ttc gaa aga acg gtt taa gtt tgc cat ttc 3'), welches an

seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase ein Gen, kodierend für das Peptid (Gly)₄Ser-(Gly)₃Ser-(Gly)₃-Cys, einführt, verwendet. Unmittelbar hinter dem Codon für Cystein 167 (tgc) wird mit dem Oligonukleotid C-Cys167 ein Stopcodon und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bam*HI in die DNA-Sequenz eingeführt. Es wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 549 bp erhalten. Es wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-pNCO-Cys167-BS-LuSy erhalten.

- B) Bei der Überprüfung der Molekülmasse des monomeren Proteinstranges (Cys167-BS-LuSy) analog Beispiel 15 D) konnte eine Bande bei ca. 17,1 kDa beobachtet werden. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 5 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- C) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 1 N) bis Q) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (BS-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 17

Kopplung eines 12 Aminosäuren langen Peptids mit der Erkennungssequenz für einen monoklonalen Antikörper (Anti-FLAG-M2/IgG1/Maus) an den N-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden FLAG-BS-LuSy-1 (5' ata ata ata aag ctt atg aat atc ata caa gga aat tta g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease HindIII einführt und Flag-BS-LuSy-2 (5' tat tat gaa ttc tta ttc gaa aga acg gtt taa g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI einführt, aus dem Plasmid pRF2 (vgl. Beispiel 1 A)) amplifiziert.

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 492 bp erhalten wurde, gereinigt.

C) Das isolierte DNA-Fragment und der Vektor pFLAG-MAC (Eastman Kodak Company, New Haven) wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease HindIII verdaut.

30,0 µl pFLAG-MAC [5 µg] bzw. 30 µl isoliertes DNA-Fragment

3,0 µl HindIII [60 U]

10,0 µl OPAU (10 x)

57,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde ebenfalls 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI eingesetzt.

D) Das isolierte DNA-Fragment und der Vektor pFLAG-MAC aus C) wurden anschließend mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut.

30,0 µl DNA-Fragmente aus C)

3,0 µl EcoRI [60 U]

24,0 µl OPAU (10 x)

63,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

E) Die weitere Vorgehensweise erfolgte gemäß Beispiel 1 G) bis L).

- F) Nach Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese gemäß Beispiel 1 M) konnte im Rohextrakt eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pFLAG-MAC-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 10 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- G) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte analog Beispiel 1 N) bis P), wobei kein signifikanter Unterschied zum Wildtypenzym beobachtet werden konnte.
- H) Zur immunologischen Überprüfung der Funktionalität des FLAG-Peptides wurde eine Western-Blot-Analyse gemäß Beispiel 1 Q), jedoch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 'Anti-FLAG[®]M2' (Eastman Kodak Company, New Haven) als 1. Antikörper (10 µl Anti-FLAG[®]M2 in 5 ml TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) und Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat als 2. Antikörper (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml TBS; vgl. Beispiel 18 H)). Nach Entwicklung der Membran konnte das Fusionsprotein bei ca. 17,7 kDa detektiert werden.
- I) Die Reinigung erfolgte analog Beispiel 2 S), es wurde jedoch kein Lysozym zum Aufschlußpuffer zugesetzt.
- J) Negativ-Kontrastierung am Elektronenmikroskop gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- K) Die Überprüfung der Quartärstruktur wurde analog Beispiel 1 S) durchgeführt. Das gereinigte Lumazinsynthase-Fusionsprotein war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen. Es konnte eine verringerte Mobilität im Vergleich zu einer Wildtyp-Lumazinsynthase, die auf den vergrößerten Durchmesser zurückzuführen ist, beobachtet werden.

Beispiel 18

Kopplung eines 6 Aminosäuren langen Peptids (6 x Histidin) zur Bindung an Ni-Chelat-Affinitätsmatrix, zur Bindung eines monoklonalen Antikörpers (Penta-His) bzw. zur Bindung von Ni-NTA-HRP-Konjugat an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde zunächst mit den Oligonukleotiden RibH-1 (vgl. Beispiel 1 A)) und RibH-His6-C-1 (5' gtg gtg atg gtg atg ttc gaa aga acg gtt taa g 3'), welches an seinem 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende des Lumazin-

- synthasogens aus *Bacillus subtilis* und am 5'-Ende für einen Teil des Affinitätspeptids kodiert, aus dem Plasmid pRF2 (vgl. Beispiel 1 A)) amplifiziert.
- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 492 bp erhalten wurde, gereinigt und als Matrize für eine 2. PCR gemäß Beispiel 1 C), jedoch mit der Oligonukleotidkombination EcoRI-RBS-2 (vgl. Beispiel 2 A)) und RibH-His6-C-2 (5' tat tat gga tcc tta atg gtg gtg atg gtg atg 3'), welches die His6-Domäne in 3'-Richtung vervollständigt, unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett dieser Domäne ein Stopcodon in die Sequenz einführt und unmittelbar hinter diesem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI* beinhaltet, verwendet wurde.
- C) Der PCR-Ansatz aus B) wurde analog Beispiel 1 B) gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 528 bp erhalten.
- D) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-C-His6-BS-LuSy erhalten wurde.
- E) Nach Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese gemäß Beispiel 1 M) konnte im Rohextrakt eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,1 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-His6-BS-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 30 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- F) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte analog Beispiel 1 N) bis P), wobei kein signifikanter Unterschied zum Wildtypenzym beobachtet werden konnte.
- G) Zur immunologischen Überprüfung der Funktionalität des His6-Peptides wurde eine Western-Blot-Analyse gemäß Beispiel 1 Q), jedoch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 'Penta-His™ Antibody' (Quiagen, Hilden) als 1. Antikörper (10 µl Penta-His™ Antibody in 5 ml TBS (siehe Beispiel 17 H)) und Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat als 2. Antikörper (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml TBS). Nach Entwicklung der Membran konnte das Fusionsprotein bei ca. 17,1 kDa detektiert werden.
- H) Der Nachweis der Zugänglichkeit der His6-Peptide im nativen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). In die 1. von 8 Probestaschen wurde je 100 µl der Rohextraktlösung aus D) (ca. 5-8 mg/ml Gesamtprotein) gegeben. In die Probestaschen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probestasche wurde freigelassen. 50 µl aus Probestasche 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probestasche 2 verdünnt (10

x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probentasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probentasche 3 verdünnt, etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probentasche 7 verworfen, so daß nun alle Probentaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und übernacht bei 37 °C inkubiert. Die nicht mit Fusionsprotein bedeckte Kunststoffoberfläche der Probentasche wurde mit je 350 µl Abdecklösung (3 % Milchpulver in PBS) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Abdecklösung wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Penta-His[™] Antibody (Quiagen, Hilden) in 5 ml Verdünnungslösung verdünnt (1. Antikörper). Jeweils 50 µl 1. Antikörper wurden in die Probentaschen 1 - 8 pipettiert und 2 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der 1. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl des 2. Antikörpers (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat in 5 ml Verdünnungslösung, Sigma, München) mit einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C. Der 2. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (100 mg o-Phenylendiamin in 25 ml Substratpuffer, 50 mM Citronensäure, pH 5) für die Peroxidase und Messung der Extinktion bei 492 nm. Das Fusionsprotein konnte von den hochspezifischen Penta-His-Antikörpern erkannt werden. Es konnte eine konzentrationsabhängige (log2 Verdünnung von gebundenem Fusionsprotein) Signalverringerng beobachtet werden.

- I) Negativ-Kontrastierung am Elektronenmikroskop gemäß Beispiel 1 P) zeigten hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.
- J) Die Überprüfung der Quartärstruktur wurde analog Beispiel 1 S) durchgeführt. Das gereinigte Lumazinsynthase-Fusionsprotein war als diskrete Bande auf dem nativen Gel zu sehen. Es konnte eine verringerte Mobilität im Vergleich zu einer Wildtyp-Lumazinsynthase, die auf den vergrößerten Durchmesser zurückzuführen ist, beobachtet werden.

Beispiel 19

Herstellung von Mischungen aus C-Biotag-BS-LuSy und C-His6-BS-LuSy auf dem Wege der gesteuerten in vitro Rückfaltung der unlöslichen Proteine

- A) Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XL1-pNCO-C-Biotag-BS-LuSy (Beispiel 14) erfolgte gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 500 ml.
- B) Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XL1-pNCO-C-His6-BS-LuSy (Beispiel 18) erfolgte ebenfalls gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 500 ml.
- C) Der Aufschluß der Zellen aus A) erfolgte unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 40 ml Abtrennpuffer (50 mM Tris pH 9,5) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge mit SS34-Rotor; 5000 Umin⁻¹, 4 °C, 10 min), der Überstand (Rohextrakt A-1) abgetrennt und das Zellpellet (Rückstand A-1) weiterverarbeitet.
- D) Der Aufschlußvorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt, wobei der Rückstand A-1 aus C) wiederum in 40 ml Abtrennpuffer suspendiert wurde. Die weitere Durchführung erfolgte analog C). Es wurde Rohextrakt A-2 und unlöslicher Rückstand A-2 erhalten.
- E) Der Aufschluß der Zellen aus B) erfolgte ebenfalls unter Verwendung einer Ultraschall-erzeugenden Apparatur (Branson-Sonifier B-12A, Branson SONIC Power Company, Dunbury, Connecticut). Zum Aufschluß wurde das gewaschene Zellpellet in 40 ml Abtrennpuffer (50 mM Tris pH 9,5) suspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann 15 mal mit der Nadelsonde des Ultraschallgerätes bei Stufe 5 behandelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min auf Eis gekühlt. Der Vorgang wurde insgesamt 4 mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge mit SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹, 4 °C, 30 min), der Überstand-B abgetrennt und weiterverarbeitet.
- F) Der unlösliche Rückstand A-2 (C-Biotag-BS-LuSy) aus D) wurde in 40 ml Solubilisierungspuffer (50 mM Tris, pH 9,5, 6 M Guanidiniumthiocyanat (G-SCN), 100 mM Dithiothreitol (DTE)), während 24 h unter Rühren bei Raumtemperatur solubilisiert.
- G) Zum löslichen Überstand-B (40 ml) wurden 6 M G-SCN und 100 mM DTE gegeben und 24 h unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert.

- H) Die Solubilisierungslösung aus F) wurde einer Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 25 °C) unterworfen und Rückstand-A-3 und Überstand-A-3 erhalten.
- I) Anschließend wurden Portionen von Überstand-A-3 und Rückstand-A-3 unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.
- J) Die Überprüfung der Überstände wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt.
- K) Zur Überprüfung von Rückstand-A-3 wurde eine Spatelspitze des Rückstandes mit 200 µl Proteinauftragspuffer (siehe Beispiel 1 M)) suspendiert und 15 min auf siedendem Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die verbliebenen unlöslichen Bestandteile der Probe in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert (15000 Umin⁻¹, 5 min, 4 °C) und 6 µl des klaren Überstandes auf das Sammelgel aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog Beispiel 1 M).
- L) Aus J) und K) zeigte sich, daß sich das unlösliche Protein C-Biotag-BS-LuSy zu ca. 80 % unter den angegebenen Bedingungen solubilisieren läßt.
- M) Der erhaltene Rückstand-A-3 aus H) wurde nochmals den Schritten F) und H) bis K) unterworfen. Die Solubilisierungsrate konnte nicht verbessert werden.
- N) Die Fusionsproteinmengen der beiden Überstände A-3 und B waren vergleichbar.
- O) 2 ml Überstand-C-Bio-BS-LuSy (Überstand-A-3) und 2 ml Überstand-C-His6-BS-LuSy (Überstand-B) wurden gemischt (Mischung A).
- P) 3,5 ml Überstand-C-Bio-BS-LuSy und 0,5 ml Überstand-C-His6-BS-LuSy wurden gemischt (Mischung B).
- Q) Mischung A und Mischung B wurden 48 h bei Raumtemperatur gerührt.
- R) Mischung A und Mischung B aus Q) wurden anschließend gegen 400 ml Abtrennpuffer, der 8 M Harnstoff und 1 mM DTE enthielt während 18 h bei Raumtemperatur dialysiert.
- S) Zu beiden Mischungen wurde anschließend 6,6 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion gegeben und 8 h bei Raumtemperatur gerührt und Mischung A-Nitro bzw. Mischung B-Nitro erhalten.
- T) Mischung A-Nitro und Mischung B-Nitro wurden in einen Dialyseschlauch überführt und gegen 32 ml (5-faches Volumen) Rückfaltungspuffer A (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, 1 mM DTE, 0,02 % Na-Azid) 12 Stunden bei 4 °C dialysiert und Mischung A-1/5 und Mischung B-1/5 erhalten.
- U) Anschließend wurde der Dialysepuffer aus T) mit 40 ml Rückfaltungspuffer B (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 mM DTE, 0,02 % Na-Azid) verdünnt und weitere 24 h bei 4 °C dialysiert (Mischung A-1/10 und Mischung B-1/10).

- V) Anschließend wurde der Dialysepuffer aus U) mit 80 ml Rückfaltungspuffer B verdünnt und weitere 24 h bei 4 °C dialysiert und die Dialysate Mischung A-1/20 und Mischung B-1/20 erhalten.
- W) Mischung A-1/20 und Mischung B-1/20 wurden anschließend gegen 72 ml (10-faches Volumen) Rückfaltungspuffer C (100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.0, 1 mM DTE, 0,25 mM 5-Nitro-6-(D-ribitylamino)2,4-(1H,3H)-pyrimidindion, 0,02 % Na-Azid) 24 h bei 4 °C dialysiert und Mischung A-1/200 und Mischung B-1/200 erhalten.
- X) Nach Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 20 min; 4 °C) wurden Portionen von Überstand-Mischung A-1/200 bzw. Mischung B-1/200 und Rückstand-Mischung A-1/200 bzw. Mischung B-1/200 unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.
- Y) Die Überprüfung der Überstände wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt.
- Z) Die Überprüfung der Rückstände erfolgte analog K).
- AA) Aus Y) und Z) zeigte sich, daß sich ca. 50-80 % gemischtes Lumazinsynthase-Konjugat unter den angegebenen Bedingungen erzeugen läßt. Die Fusionsproteinmengen der eingesetzten Proteinmengen entsprachen sich im rückgefalteten Zustand (abgeschätzt vom SDS-PAGE), so daß kein Unterschied im Rückfaltungsverhalten der beiden Fusionsproteine festgestellt werden konnte.
- BB) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte analog Beispiel 1 S), wobei jedoch 40 µl Proteinlösung (Überstand-Mischung A-1/200, Überstand-Mischung B-1/200) eingesetzt wurde. Die renaturierten Fusionsprotein-Mischungen waren als diskrete Banden auf dem nativen Polyacrylamidgel zu sehen. Die Mobilität war vergleichbar mit den Mobilitäten der renaturierten Proteine C-Bio-BS-LuSy und C-His6-BS-LuSy, was höchstwahrscheinlich auf den ähnlichen hydrodynamischen Durchmesser der Proteine zurückzuführen ist. Mit der oben beschriebenen Maßnahme konnte demnach renaturiertes, ikosaedrisches, aus 60 Untereinheiten bestehendes Fusionsprotein erhalten werden.
- CC) Der Nachweis der beiden Untereinheiten im renaturierten ikosaedrischen Protein erfolgte unter Verwendung von Mikrotiterplatten und eines Mehrkanalphotometers (ELISA-reader). Die Beschichtung der Näpfe mit Avidin erfolgte analog Beispiel 14 M). In die 1. von 8 Probenfächerchen wurde je 100 µl der renaturierten Probenlösung aus W) (ca. 0,5-1 mg/ml) gegeben. In die Probenfächerchen 2 - 8 wurden jeweils 50 µl Verdünnungslösung (1 % Milchpulver in PBS) gegeben. Die 8. Probenfächerchen wurde freigelassen. 50 µl aus Probenfächerchen 1 wurden mit den 50 µl Verdünnungslösung in Probenfächerchen 2 verdünnt (10

x auf und ab pipettieren). 50 µl aus Probentasche 2 wurden anschließend mit 50 µl Verdünnungslösung aus Probentasche 3 verdünnt. etc.. Zum Schluß wurden 50 µl aus Probentasche 7 verworfen, so daß nun alle Probentaschen 50 µl Probenlösung in verschiedenen Konzentrationen (log 2 Verdünnung) enthielten. Die Proben wurden mit Klebefolie abgedeckt und übernacht bei 37 °C inkubiert und danach wurde 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 10 µl Penta-His[™] Antibody (Quiagen, Hilden) in 5 ml Verdünnungslösung verdünnt (1. Antikörper). Jeweils 50 µl 1. Antikörper wurden in die Probentaschen 1 - 8 pipettiert und 2 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der 1. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl des 2. Antikörpers (10 µl Anti-Maus-IgG-HRP-HRP-Konjugat in 5 ml Verdünnungslösung, Sigma, München) mit einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C. Der 2. Antikörper wurde anschließend abgegossen, die Mikrotiterplatte kurz ausgeklopft und die Probentaschen 3 x mit jeweils 350 µl Waschlösung (PBS) gewaschen. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgte unter Zugabe von 150 µl Substratlösung (100 mg o-Phenylendiamin in 25 ml Substratpuffer, 50 mM Citronensäure, pH 5) für die Peroxidase und Messung der Extinktion bei 492 nm. Überstand-Mischung A-1/200 und Überstand-Mischung B-1/200 konnten von den hochspezifischen Penta-His-Antikörpern erkannt werden. Es konnte eine konzentrationsabhängige (log2 Verdünnung von gebundenem Fusionsprotein) Signalverringering beobachtet werden. Bei Überstand-Mischung A-1/200 konnte ein stärkeres Signal als bei Überstand-Mischung B-1/200 beobachtet werden. Zur Bindung an die Avidin-beschichtete Mikrotiterplatte genügt theoretisch ein Biotinmolekül, während die Signalstärke mit der Anzahl von His6-Epitopen pro Molekül korreliert. In Überstand-Mischung A-1/200 sind pro Ikosaeder mehr His6-Epitope enthalten als im Vergleichskonstrukt Überstand-Mischung B-1/200, so daß bei Überstand-Mischung A-1/200, wie der praktische Versuch bestätigt, ein stärkeres Signal zu erwarten ist. Aus diesem Ergebnis folgt, daß mit den oben beschriebenen Rückfaltungsmaßnahmen Ikosaeder erhalten wurden, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen.

Beispiel 20

Herstellung der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung von 11, an die *Escherichia coli* Codonsverwendung angepasster synthetischer Oligonukleotide und einer 6-stufigen Polymerase-Kettenreaktion (Deckert et al., 1998)

A) Das erste Teilstück des Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden AQUI-1 (5'gct gcg ggt gaa ctg gcg cgt aaa gag gac att gat gct gtt atc gca att ggc gtt ctc atc 3'; Strangprimer) und AQUI-2 (5'cta atg aaa ggt tcg cga ggc ctt ttg aaa ctt cag agg cga tat aat cga aat gtg gcg ttg 3'; Gegenstrangprimer) unter Verwendung des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* als Matrize (Vektor pNCO-BS-LuSy, vgl. Beispiel 1 G)) amplifiziert. Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene; Grosjean und Fiers, 1982; Ikemura, 1981; Wada et al. 1992) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-1 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease MfeI (C*AATTG) und AQUI-2 für StuI (AGG*CCT).

10 µl PCR-Puffer (75 mM Tris/HCl, pH 9.0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.01 % (w/v) Tween 20)

6 µl Mg²⁺ [1,5 mM]

8 µl dNTP's [je 200 µM]

1 µl AQUI-1 [0,5 µM]

1 µl AQUI-2 [0,5 µM]

1 µl pNCO-BS-LuSy (vgl. Beispiel 1) [10 ng]

1 µl Goldstar-Taq-Polymerase [0,5 U] (Eurogentec, Seraing, Belgien)

72 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde im Thermocycler (GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer)

bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 1. 5,0 min 95 °C

2. 0,5 min 94 °C

3. 0,5 min 50 °C

4. 0,5 min 72 °C

5. 5,0 min 72 °C

6. abkühlen auf 4 °C

Die Schritte 2. - 4. wurden 20 x wiederholt.

B) Der PCR-Ansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3 % Agarose) aufgetrennt, die DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Fragment mit einer Länge von 132 bp mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte gemäß Beispiel 1 B).

- C) 10 ng der isolierten DNA aus B) dienten anschließend als Matrize für eine 2.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-3 (5' act ctg gtt cgt gtt cca ggc tca tgg gaa ata ccg gtt gct gcg ggt gaa ctg gcg cgt aaa g 3'; Strangprimer) und AQUI-4 (5' cca agg tgt cag ctg taa taa cac cga agg tga tag gtt tac gta gtt cta atg aaa ggt tgg cga ggc c 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung für stark exprimierte Gene (Grosjean und Fiers, 1982; Ikemura, 1981; Wada et al. 1992) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-3 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease AgeI (A*CCGGT) und AQUI-4 für SnaBI (TAC*GTA) und PvuII (CAG*CTG). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.
- D) Das Produkt aus C) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 219 bp erhalten.
- E) 10 ng der isolierten DNA aus D) dienten anschließend als Matrize für eine 3.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-5 (5' gga ggg tgc aat tga ttg cat agt ccg tca tgg cgg ccg tga aga aga cat tac tct ggt tgg tgt tcc agg c 3'; Strangprimer) und AQUI-6 (5' gtt gcc gtg ttt tgt gcc ggc gcg ctc gat agc ctg ttc caa ggt gtc agc tgt aat aac 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-5 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EagI (C*GGCCG) und AQUI-6 für BssHII (G*CGCGC) und PvuII (CAG*CTG). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.
- F) Das Produkt aus E) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 309 bp erhalten.
- G) 10 ng der isolierten DNA aus F) dienten anschließend als Matrize für eine 4.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-7 (5' cgg tat cgt agc atc acg ttt taa tca tgc tct tgt cga ccg tct ggt gga ggg tgc aat tga ttg cat ag 3'; Strangprimer) und AQUI-8 (5' gaa taa gtt tgc cat ttc aat ggc aga aag cgc tgc ttc cca acc ttt gtt gcc gtg ttt tgt gcc ggc 3'; Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-7 enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease SalI (G*TCGAC) und AQUI-8 für Eco47III (AGC*GCT). Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.
- H) Das Produkt aus G) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 405 bp erhalten.
- I) 10 ng der isolierten DNA aus H) dienten anschließend als Matrize für eine 5.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-9 (5' atg caa atc tac gaa ggt aaa cta act gct gaa ggc ctt cgt ttc ggt

atc gta gca tca cgt ttt aat c 3': Strangprimer) und AQUI-10 (5' tat tat gga tcc tta tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc cat ttc aat gg 3': Gegenstrangprimer). Beide Oligonukleotide wurden an die optimale Codonverwendung (für stark exprimierte Gene) von *Escherichia coli* angepasst. AQUI-9 vervollständigt das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* und enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease StuI (AGG*CCT). Das Oligonukleotid AQUI-10, welches am 3'-Ende zum Gen der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* komplementär ist, führt unmittelbar hinter dem Stopcodon eine Erkennungssequenz für die Endonuklease BamHI (G*GATCC) ein. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.

- J) Das Produkt aus I) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 476 bp erhalten.
- K) 10 ng der isolierten DNA aus J) dienten anschließend als Matrize für eine 6.PCR mit den Oligonukleotiden AQUI-11 (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg caa atc tac gaa ggt aaa cta ac 3'; Strangprimer) und AQUI-10 (Gegenstrangprimer). Das Oligonukleotid AQUI-11 ist am 3'-Ende zum 5'-Ende des synthetischen Gens für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* komplementär. Am 5'-Ende führt es eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI vor dem Startcodon ein. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte wie unter A) beschrieben.
- L) Das Produkt aus K) wurde wie unter B) beschrieben gereinigt und ein DNA-Fragment mit einer Länge von 510 bp erhalten.
- M) Die weitere Verarbeitung des DNA-Fragmentes aus L) erfolgte wie unter Beispiel 1 E)-G) wobei das Plasmid pNCO-AA-LuSy erhalten wurde.
- N) Anschließend wurden die Schritte H)-M) gemäß Beispiel 1 durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 16,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne das betreffende Plasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine.
- O) Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte gemäß Beispiel 1 N). Das Protein zeigte eine optimale Aktivität im Bereich von 80 - 90 °C.
- P) Die Negativkontrastierung erfolgte gemäß Beispiel 1 P) und zeigte hohle, sphärische Partikel mit einem Außendurchmesser von ca. 15 nm und einem Innendurchmesser von ca. 5 nm.

- Q) Die Reinigung des Proteins erfolgte in zwei Schritten: Die Kultivierung des *Escherichia coli* Stammes XLI-pNCO-AA-LuSy erfolgte gemäß Beispiel 1 K), jedoch in einem Volumen von 1 l. Der Aufschluß erfolgte gemäß Beispiel 1 R). Der klare Überstand wurde anschließend im Wasserbad 20 min bei 90 °C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor; 15000 Umin⁻¹; 4 °C; 30 min). Mit diesem Schritt konnte eine Anreicherung des Zielproteins um Faktor 4 erreicht werden (abgeschätzt von SDS-PAGE). Die weitere Reinigung erfolgte gemäß Beispiel 2 S) unter Verwendung des Überstandes nach der Zentrifugation und einer Gelfiltrationssäule.
- R) Die Überprüfung der Quartärstruktur erfolgte gemäß Beispiel 1 S) und ergab ein mit der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* vergleichbares Ergebnis.

Beispiel 21

Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

- A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-NotI (5' tat tat tat agc ggc cgc tcg gag aga ctt gaa taa g 3') aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUI-C-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase und führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).
- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 513 bp erhalten wurde, gereinigt.
- C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.
- D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 498 bp erhalten.
- E) 5 µg des Expressionsplasmids *pNCO-C-Biotag-BS-LuSy* (Beispiel 14) in einem Volumen von 30 µl wurden analog Beispiel 8 G) und H) behandelt. Das DNA-Fragment mit einer Länge von 3437 bp wurde isoliert und gereinigt.

- F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-C-Biotag-AA-LuSy erhalten wurde.
- G) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthese gemäß Beispiel 1 N) konnte nur eine enzymatische Aktivität, die der Aktivität des *Escherichia coli* Stammes XL1 entsprach, ermittelt werden.
- H) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-C-Biotag-AA-LuSy konnte keine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-C-Biotag-AA-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war.
- I) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 14 H) bis M). Es konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

Beispiel 22

Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurenfolge H-H-H-H-H-H-A-A-A an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthese aus *Aquifex aeolicus*

- A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthese aus *Aquifex aeolicus* wurde analog Beispiel 21 unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-HIS₆-NotI (5' tat tat tat agc ggc cgc atg gtg gtg atg gtg atg tcg gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3') aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUI-C-HIS₆-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthese und führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthese eine Sequenz, kodierend für 6 Histidinmoleküle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).
- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 531 bp erhalten wurde, gereinigt.
- C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.
- D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 516 bp erhalten.

- E) Der Expressionsvektor wurde gemäß Beispiel 21 E) vorbereitet.
- F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis J), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-HIS6-C-Biotag-AA-LuSy* erhalten wurde.
- G) Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Beispiel 1 R). Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand verworfen und mit dem verbliebenen Rückstand weitergearbeitet.
- H) Der unlösliche Rückstand aus G) wurde in 50 ml NTA-Puffer A (50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,02 % Na-Azid, 6 M Guanidiniumhydrochlorid) während 24 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 15000 Umin⁻¹, 20 °C, 20 min). Der Überstand wurde dekantiert und mit 6 ml Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden) versetzt und über Nacht unter umschwenken inkubiert (20 °C). Anschließend wurde die Suspension einer Zentrifugation unterworfen (800 g, 20 °C, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert. Der Rückstand wurde in 10 ml NTA-Puffer-A aufgenommen und 15 min unter umschwenken bei 20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (s.o.) und Abnahme des Überstandes wurde der Rückstand in 10 ml NTA-Puffer-B (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 6,3) für 15 min bei 20 °C inkubiert und weiterverarbeitet (s.o.). Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit je 10 ml NTA-Puffer-C (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 5,9) behandelt. Zum Schluß wurde der Rückstand zweimal mit je 10 ml NTA-Puffer-D (8 M Harnstoff, 100 mM Na-Phosphat-Puffer, 10 mM Tris pH 4,5) gewaschen. Die Verunreinigungen konnten mit NTA-Puffer-B entfernt werden, das Zielprotein wurde mit NTA-Puffer-C bzw. D eluiert. Auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (nach Neutralisation) gemäß Beispiel 1 M) konnte nur noch eine singuläre Bande bei 19,3 kDa beobachtet werden.

Beispiel 23

Kopplung eines artefiziellen 13 Aminosäuren langen, in vivo biotinylierfähigen Peptids, über einen Linker bestehend aus den Aminosäuren H-H-H-H-H-H-G-G-S-G-A-A-A an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

- A) Das Gen für die synthetische Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde analog Beispiel 21 unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-C-HIS₆-GLY₂-SER-GLY-NotI (5' tat tat tat agc ggc cgc gcc aga acc gcc atg gtg gtg atg gtg atg tgc gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3') aus

dem Plasmid pNCO-AA-LuSy (siehe Beispiel 20) amplifiziert. Das Oligonukleotid AQUIC-HIS₆-GLY₂-SER-GLY-NotI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase, führt unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett der Lumazinsynthase eine Sequenz, kodierend für das Peptid H-H-H-H-H-H-G-G-S-G, und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease NotI (GC*GGCCGC) ein. Diese Erkennungssequenz wird in drei Alaninmoleküle translatiert. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

- B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 543 bp erhalten wurde, gereinigt.
- C) Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI analog Beispiel 8 F) verdaut und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt.
- D) Das gereinigte DNA-Fragment aus C) wurde analog Beispiel 8 H) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt und ein Fragment mit der Länge von 528 bp erhalten.
- E) Der Expressionsvektor wurde gemäß Beispiel 21 E) vorbereitet.
- F) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-pNCO-HIS6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-LuSy erhalten wurde.
- G) Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß Beispiel 22 G) bis H) wobei ein vergleichbares Ergebnis erzielt wurde.

Beispiel 24

Herstellung eines chimären Proteins bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

- A) Ein Teil des Gens für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion und der synthetischen Oligonukleotide EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und BS-LuSy-AgeI (5' tat tat tat aac cgg tat ttc aaa tgc gcc 3') aus dem Plasmid pNCO-BS-LuSy (siehe Beispiel 1) amplifiziert. Das Oligonukleotid BS-LuSy-AgeI ist an seinem 3'-Ende komplementär zum Gen für die Lumazinsynthase und führt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease AgeI (A*CCGGT) in die DNA-Sequenz ein. Die Durchführung der PCR erfolgte analog Beispiel 1 A).

B) Der PCR-Ansatz wurde gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 225 bp erhalten wurde, gereinigt. Das gereinigte DNA-Fragment aus B) wurde mit der Restriktionsendonuklease AgeI verdaut.

30,0 µl DNA-Fragmente aus C)

4,0 µl AgeI [8 U]

10,0 µl Puffer 1 (10 x) [10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.0]

56,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 25 °C inkubiert und wie unter B) beschrieben gereinigt und zum Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI eingesetzt.

C) Verdau des gereinigten Fragmentes aus B) mit der Restriktionsendonuklease EcoRI.

30,0 µl DNA-Fragment aus B)

3,0 µl EcoRI [60 U]

20,0 µl OPAU (10 x)

47,0 µl H₂O_{bidest}

Der Ansatz wurde 180 min bei 37 °C inkubiert und das entstandene DNA-Fragment wie unter Beispiel 1 B) beschrieben gereinigt.

D) Das Plasmid PNCO-AA-LuSy (30 µl, 5 µg) wurde analog B) und C) behandelt und anschließend gemäß Beispiel 1 B) gereinigt, wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 3676 bp erhalten wurde.

E) Die weitere Verarbeitung erfolgte analog Beispiel 1 E) bis L), wobei der *Escherichia coli* Expressionsstamm XL1-*pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy* erhalten wurde.

F) Bei der Überprüfung der Funktionalität der Lumazinsynthase gemäß Beispiel 1 N) konnte eine enzymatische Aktivität ermittelt werden.

G) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe der löslichen Proteine wurde analog Beispiel 1 M) durchgeführt. Im Rohextrakt des Stammes XL1- *pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy* konnte eine signifikante Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16,4 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne *pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-LuSy* Expressionsplasmid nicht zu sehen war.

Beispiel 25

Herstellung eines Vektors zur rekombinanten N-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (Fremdpeptide können auch ohne Linker direkt an das Trägerprotein fusioniert werden; hierfür wird die singuläre

Restriktionsschnittstelle BglII verwendet, die sich in der Sequenz des Trägerproteins befindet)

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden AQUI-11-BglII (5' ata ata gaa ttc att aaa gag gag aaa tta act atg cag atc tac gaa gg 3'), welches am 3'-Ende teilweise komplementär zum 5'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist, wobei durch eine stille Mutation eine singuläre Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BglII (A*GATCT) eingeführt wird und am 5'-Ende eine ribosomale Bindungsstelle und eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI einführt, und AQUI-10 (siehe Beispiel 20 I)) aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.
- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 510 bp erhalten wurde.
- C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-BglII-LuSy* erhalten.
- D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-BglII-LuSy konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16,7 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-BglII-LuSy-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 26

Herstellung eines Vektors zur C-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-10-(BamHI) (5' tat tat gga tcc tgc gag aga ctt gaa taa gtt tgc 3'), welches am 3'-Ende komplementär zum 3'-Ende der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* ist und unmittelbar hinter dem letzten kodierenden Basentriplett eine singuläre Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI (G*GATCC) einführt (das, in der ursprünglichen Sequenz enthaltene Stopcodon wird aufgelöst: als neues Stopcodon dient ein, in der Vektorsequenz vorhandenes Stopcodon),

aus dem Plasmid pNCO-AA-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.

- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 507 bp erhalten wurde.
- C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-LuSy*-(BamHI) erhalten.
- D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-LuSy-(BamHI) konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,8 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-LuSy-(BamHI)-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).
- E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Beispiel 27

Herstellung eines Vektors zur gleichzeitigen N- und C-terminalen Fusion von Fremdpeptiden an die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*

- A) Das Gen für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* wurde mit den Oligonukleotiden EcoRI-RBS-2 (siehe Beispiel 2 A)) und AQUI-10-(BamHI) (siehe Beispiel 26), aus dem Plasmid pNCO-AA-BglII-LuSy amplifiziert. Die PCR wurde analog Beispiel 1 A) durchgeführt.
- B) Die Reinigung des PCR-Ansatzes erfolgte gemäß Beispiel 1 B), wobei ein DNA-Fragment mit einer Länge von 507 bp erhalten wurde.
- C) Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog Beispiel 1 B), E) bis L). Es wird das Plasmid *pNCO-AA-BglII-LuSy*-(BamHI) erhalten.
- D) Die Überprüfung der Expressionsrate bzw. der Größe des monomeren Proteinstranges erfolgte analog Beispiel 1 M). Im Rohextrakt des Stammes XL1-pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI) konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 17,8 kDa beobachtet werden, die in einem Vergleichsstamm ohne pNCO-AA-BglII-LuSy-(BamHI)-Expressionsplasmid nicht zu sehen war. Die beobachtete Bande entsprach einem Anteil von ca. 20 % bezogen auf alle löslichen Proteine (geschätzt).

E) Die weitere Analytik wurde gemäß Beispiel 20 O) bis R) durchgeführt, wobei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Enzym (AA-LuSy) zu beobachten waren.

Literatur

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, David J. Lipman (1997)

Gapped BLAST and Psi-BLAST: a new generation of protein database search programs

Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402

Bacher A. and R. Ladenstein (1991)

The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis* in Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins, Band 1 (F. Müller, ed.) CRC Press, Boca Raton. 293-316

Bacher A., H. C. Ludwig, H. Schnepfle and Y. Ben-Shaul (1986)

Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Quaternary structure and reaggregation.

J. Mol. Biol., 187, 75-86

Bacher A., H. Schnepfle, B. Mailänder, M. K. Otto and Y. Ben-Shaul (1980)

Structure and function of the riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis* in Flavins and Flavoproteins, (K. Yagi and T. Yamano, eds.) Japan Scientific Societies Press, 579-586

Bacher A., S. Eberhardt, M. Fischer, S. Mörtl, K. Kis, K. Kugelbrey, J. Scheuring and K. Schott (1997)

Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase and riboflavin synthase
Methods Enzymol., 280, 389-399

Birnboim H.C., J. Doly (1979)

A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA
Nucl. Acids. Res., 7, 1513-1522

Bradford M. (1976)

A rapid and selective method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal. Biochem., 72, 248-254

Brigidi P., E. Rossi, M. Bertarini, G. Riccardi, D. Matteuzzi (1990)

Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation

FEMS Microbiology Letters, 67, 135-138

Bullock W.O., J.M. Fernandez, J.M. Short (1987)

XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -Galactosidase selection

BioTechniques, 5, 376-379

Clackson T., D. Güssow, P.T. Jones (1991)

General applications of PCR to gene cloning and manipulation

In: M.J. McPherson, P. Quirke, G.R. Taylor (eds.); PCR: A practical approach (187-214). Oxford Press

Cohn E. und Edsall J. (1943)

Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions

Reinhold, New York

Compton S.J., C.G. Jones (1985)

Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay

Annal. Biochem., 151, 369

Cronan J.E. (1990)

Biotination of proteins in vivo

The Journal of biological Chemistry, 265/18,10327-10333

Dalsgaard K., Uttenthal A., Jones T., Xu F., Merryweather A., Hamilton W., Langeveld J., Boshuizen R., Kamstrup S., Lomonossoff G., Porta C., Vela C., Casal J., Meloen R., Rodgers P. (1997)

Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease

Nature Biotechnology, Volume 15, 248-252

Davis L.G., M.D. Dibner, J.F. Battey (1986)

Basic Methods in molecular biology

Elsevier, New York, Amsterdam, London

Deckert G., Warren P., Gaasterland T., Young W., Lenox A., Graham D., Overbeek R.,

Snead M., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R., Short J., Olsen G., Swanson R. (1998)

The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*

Nature, 392, 353-358

Dower W.J., J.F. Miller, C.W. Ragsdale (1988)

- High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation
Nucl. Acids Res., 16, 6127-6145
- Glick B. R., Pasternak J.J. (1995)
Molekulare Biotechnologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Grosjean H. und W. Fiers (1982)
Preferential codon usage in procaryotic genes-the optimal codon-anticodon interaction
energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes
Gene, 18, 199-209
- Hennecke H., Günther I., Binder F. (1982)
A novel cloning vector for the direct selection of recombinant DNA in *Escherichia coli*
Gene, 19, 231-234
- Henner D. (1990)
Expression of Heterologous Genes in *Bacillus subtilis*
Meth. Enzymol., 185, 199
- Ikemura T. (1981)
Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the
occurrence of the respective codons in ist protein genes: A proposal for a synonymous
codon choice that is optimal for the E. coli translational system
J. Mol. Biol., 151, 389-409
- Ladenstein R., B. Meyer, R. Huber, H. Labischinski, K. Bartels, H.-D. Bartunik, L. Bachmann, H. C. Ludwig and A. Bacher (1986)
Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Particle dimensions, crystal packing
and molecular symmetry.
J. Mol. Biol., 187, 87-100
- Ladenstein R., H. D. Bartunik, M. Schneider, R. Huber, K. Schott and A. Bacher (1986)
Structure of the riboflavin synthase/lumazine synthase complex. Arrangement and
chain folding of β subunits in the icosahedral capsid.
in Chemistry and Biology of Pteridines, (B. A. Cooper, V. M. Whitehead, eds.) Walter
de Gruyter, Berlin, 103-106
- Ladenstein R., K. Ritsert, R. Huber, G. Richter and A. Bacher (1994)
The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: X-ray

structure analysis of reconstituted β_{60} capsids at 3.2 Å resolution

Eur. J. Biochem., 223, 1007-1017

Ladenstein R., M. Schneider, R. Huber, H. D. Bartunik, K. Wilson, K. Schott and A. Bacher (1988)

Heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. Crystal structure analysis of the icosahedral β_{60} capsid at 3.3 Å resolution

J. Mol. Biol., 203, 1045-1070

Ladenstein R., M. Schneider, R. Huber, K. Schott and A. Bacher (1988)

The structure of the icosahedral β_{60} capsid of heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*

Z. Kristallographie, 185, 122-124

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4
Nature, 227, 680-685

Laue T., Shah B., Ridgeway T., Pelletier S. (1992)

Computer aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins
in: Harding S., Rowe A., Horton J. (eds.) Analytical ultracentrifugation in
biochemistry and polymer science

Royal society of chemistry, Cambridge, 90-125

LeGrice S.F.J. (1990)

A regulated promotor for high level expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis*

Meth. Enzymol., 185, 201

Liddell E., Weeks I. (1996)

Antikörpertechniken

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Lottspeich F., Zorbas H. (1998)

Bioanalytik

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Lovett P.S. (1981)

BR151ATCC 33677 - *Bacillus subtilis* BR151

J. Bacteriol., 146, 1162-1165

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982)

- Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Modrow S., Falke D. (1997)
Molekulare Virologie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Mörtl S., M. Fischer, G. Richter, J. Tack, S. Weinkauff and A. Bacher (1996)
Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 271, 33201-33207
- Mullis K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Ehrlich (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction
Cold Spring Harbor Symp., 51, 263-273
- Perkins J.B., J.G. Pero, A. Sloma (1991)
Riboflavin overproducing bacteria expressing the rib-operon of *Bacillus*
Eur. Pat. Appl. EP 405370 A1 910102
- Read S.M., D.H. Northcote (1981)
Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue
G dyebinding assay for protein
Anal. Biochem., 116, 53-64
- Sambrook J., E. Fritsch, T. Maniatis (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F., S. Nicklen, A.R. Coulson (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- Schatz P.J. (1993)
Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying
enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*
Bio/Technology, Oct; 11(10), 1138-1143
- Sgamarella V., J.H. van de Sande, H.G. Khorana (1979)
Studies on the polynukleotides. C. A novel joining reaction catalysed by the T4-
polynukleotide-ligase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67. 1468-1475
- Stüber D., H. Matile, G. Garotta (1990)

System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis

in: Lefkovits, I., P. Pernis (eds.) Immunological Methods, IV, 121-152

Tucker J., Grisshammer (1996)

Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*
Biochem. Journal, 317, 891-899

Wada K., Wada Y., Ishibashi F., Gojobori T., Ikemura T. (1992)

Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data.
Nucleic Acid Res., 20, 2111-2118

Winnacker E.L. (1990)

Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie
Verlag Chemie, Weinheim, Dearfield Beach, Basel

Zamenhof P.J., M. Villarejo (1972)

Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments in vivo
J. Bacteriol., 110, 171-178

Patentansprüche

1. Protein-Konjugat, bestehend aus mindestens einem Funktionsbereich an einer beliebigen Position der Sequenz eines Trägerproteinbereichs zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl dieser Funktionsbereiche kovalent verknüpft ist.
2. Rekombinant herstellbares Protein-Konjugat, bestehend aus mindestens einem Funktionsproteinbereich am N-Terminus und/oder C-Terminus und/oder inseriert in eine Schleifenregion der Sequenz eines Trägerproteinbereichs zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, so daß deren Außenperipherie mit einer Vielzahl der Funktionsproteinbereiche kovalent verknüpft ist.
3. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich eine Aminosäuresequenz - ausgewählt aus einer Sequenzmenge - aufweist, die sich dadurch ergibt, daß man für jede Aminosäureposition in der Sequenz einer vorbestimmten nativen Lumazinsynthase eine Aminosäure oder eine Deletion aus der entsprechenden Position eines Alignments der vorbestimmten Lumazinsynthase-Sequenz mit mindestens einer nativen Lumazinsynthase-Sequenz eines anderen Organismus auswählt.
4. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich die Sequenz einer nativen Lumazinsynthase aufweist.
5. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich die Sequenz einer thermostabilen nativen Lumazinsynthase aufweist.
6. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß die

thermostabile native Lumazinsynthase die Proteinsequenz der Lumazinsynthase aus einem hyperthermophilen Mikroorganismus, insbesondere aus *Aquifex aeolicus* aufweist.

7. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich aus einer Mischsequenz bestehend aus den Aminosäurenpositionen 1 - 60 der nativen Lumazinsynthase aus einem mesophilen Organismus, bezogen auf *Bacillus subtilis*, und den Aminosäurenpositionen 61 - 154 der nativen Lumazinsynthase aus einem hyperthermophilen Mikroorganismus, bezogen auf *Aquifex aeolicus*, aufgebaut ist.
8. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich aus einer beliebigen Sequenz besteht, wobei die Hauptkette dieser Sequenz in α -Helix und β -Faltblatt-Motiven faltet, wobei 4 β -Segmente ein paralleles, zentrales 4-strängiges β -Faltblatt bilden und wobei das zentrale 4-strängige β -Faltblatt auf beiden Seiten von jeweils 2 α -Helices flankiert wird, so daß sich 5 Einheiten dieser α - β Motive zu einer pentameren Struktur zusammenlagern, wobei der N-Terminus einer jeden Einheit in der benachbarten Einheit das fünfte β -Segment zum zentralen 4-strängigen β -Faltblatt bilden kann, wobei 12 dieser pentameren Unterstrukturen sich zusammenlagern und die ikosaedrische Struktur einer Lumazinsynthase bilden und die N- und C-Termini der beliebigen Sequenz mit den oben beschriebenen Strukturmerkmalen sich an der Oberfläche des gebildeten Ikosaeders befinden, und wobei die beliebige Sequenz vorzugsweise aus dem Vergleich einer Sequenzmenge verschiedener, d.h. aus verschiedenen Organismen stammenden Lumazinsynthasesequenzen, insbesondere unter Verwendung von Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997), gewonnen werden.
9. Protein-Konjugat nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich eine Sequenz einer nativen Lumazinsynthase aufweist,

bei der mindestens eine Cysteineinheit durch eine andere Aminosäure ausgetauscht oder deletiert ist oder chemisch modifiziert ist.

10. Protein-Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine Cysteineinheit an einer der Position 93 und/oder der Position 139 der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* entsprechenden Position deletiert ist oder gegen eine andere Aminosäure, vorzugsweise Serin, ausgetauscht ist.
11. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich und der Funktionsproteinbereich über ein Linkerpeptid miteinander verknüpft sind.
12. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Funktionsproteinbereich die Sequenz einer Dihydrofolatreduktase, eines Maltose-bindenden Proteins, eines in vivo biotinylierbaren Peptids, eines Antigen-wirksamen Peptids, insbesondere aus einem Oberflächenprotein eines Virus, eines durch einen monoklonalen Antikörper erkennbaren Peptids, eines zufällig generierten Peptids, oder eine chemisch derivatisierbare Aminosäure, beispielsweise Cystein oder Lysin ist.
13. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerproteinbereich chemisch modifiziert ist.
14. Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Funktionsproteinbereich chemisch modifiziert, vorzugsweise biotinyliert ist.
15. Heterooligomeres Protein-Konjugat bestehend aus Mischungen von mindestens zwei unterschiedlichen Protein-Konjugaten nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder von mindestens einem Protein-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und mindestens einem Trägerproteinbereich ohne Funktionsproteinbereich mit einer Sequenz gemäß einem der Ansprüche 3

bis 8, wobei die einzelnen Proteine gegebenenfalls durch chemische Behandlung miteinander kovalent verknüpft sind.

16. Verfahren zur Herstellung eines Protein-Konjugats nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 - a) Isolierung einer Lumazinsynthase aus einem Wild-Typ oder einem rekombinanten Organismus (Trägerprotein);
 - b) Chemische Kopplung von Funktionsmolekülen an das Trägerprotein;
 - c) Reinigung des Protein-Konjugats.
17. Verfahren zur Herstellung eines Protein-Konjugats oder eines heterooligomeren Proteins nach einem der Ansprüche 2 bis 14, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
 - a) Herstellung einer ersten DNA, die für den Trägerproteinbereich kodiert;
 - b) das Fusionieren von mindestens einer zweiten DNA, die für den Funktionsbereich und gegebenenfalls für das Linkerprotein kodiert mit dem 5'-Ende und/oder dem 3'-Ende der ersten DNA und/oder Inserieren der zweiten DNA in einem für eine Schleifenregion des Trägerproteinbereichs kodierenden Region der ersten DNA unter Bildung einer artefiziellen DNA.;
 - c) Umwandlung der artefiziellen DNA der Stufe b) in ein Expressionsplasmid;
 - d) Transformation von Wirtszellen mit einem oder mehreren der in Stufe c) erhaltenen Expressionsplasmiden;
 - e) Expression der artefiziellen DNA in den transformierten Wirtszellen unter Bildung eines Proteinkonjugats, gegebenenfalls unter der Einführung einer vorbestimmten posttranslationalen Modifikation des Protein-Konjugats in vivo, vorzugsweise durch Phosphorylierung, Glycosylierung oder Biotinylierung;
 - f) Reinigung des Protein-Konjugats;
 - g) gegebenenfalls Modifizierung des Protein-Konjugats durch chemische Kopplung von Aminosäurenresten auf der Proteinoberfläche einer aus dem Protein-Konjugat gebildeten Kapsid-Raumstruktur mit frei bestimmbaren Kopplungspartnern.

18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man ein heterooligomeres Protein herstellt durch
 - a) Mischen verschiedener, gemäß Anspruch 16, Stufe c) und/oder Anspruch 17, Stufe f) gewonnener Protein-Konjugate;
 - b) Denaturierung der erhaltenen Mischung und c) Renaturierung der Mischung; oder durch
 - a₂) Denaturierung verschiedener, gemäß Anspruch 16, Stufe c) und/oder Anspruch 17, Stufe i) gewonnener Protein-Konjugate,
 - b₂) Mischung der denaturierten Protein-Konjugate ,
 - c₂) Renaturierung der Mischung.
19. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man Protein-Konjugate einsetzt, die unter Verwendung eines faltungsunterstützenden Liganden hergestellt wurden.
20. Vektoren zur Herstellung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 2 bis 14.
21. DNA, die für ein Protein gemäß Anspruch 20 kodiert.
22. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an Position 93 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.
23. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an Position 139 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.
24. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, gekennzeichnet dadurch, daß die Aminosäure Cystein an den Positionen 93 und 139 gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht ist.

25. An die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste DNA zur Herstellung der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* in einem rekombinanten *Escherichia coli* - Stamm.
26. Protein, bestehend aus der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, zur Verwendung als Trägerprotein gemäß Anspruch 1.
27. Chimäres Protein, bestehend aus den Aminosäuren 1-60 der Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und den Aminosäuren 61-154 der Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*, zur Verwendung als Trägerprotein gemäß Anspruch 1.
28. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende des Trägerproteingens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am N-Terminus des Trägerproteinbereichs befinden, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ ;
 - b) ein DNA-Fragment, kodierend für einen beliebigen Funktionsproteinbereich;
 - c) optional: ein DNA-Fragment kodierend für ein Linkerpeptid.
29. Ein Vektor nach Anspruch 28, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für die Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin

enthält.

30. Ein Vektor nach Anspruch 28, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für das 'Maltose bindende Protein' aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für die Aminosäuresequenz SNNNNNNNNNLGIEGRISEFAAA enthält.
31. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Trägerproteingens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ (jeweils ohne Stop-Codon);
 - b) ein DNA-Fragment, kodierend für einen beliebigen Funktionsproteinbereich;
 - c) optional: ein DNA-Fragment kodierend für ein Linkerpeptid.
32. Vektor nach Anspruch 31, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, das Gen für die Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli*, kodierend für den Funktionsproteinbereich und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment kodierend für die Aminosäuresequenz LAAAGGGG enthält.
33. Vektor nach Anspruch 31, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* (gemäß Anspruch 25) kodierend für den Trägerproteinbereich und ein Genfragment, kodierend für den Funktionsproteinbereich mit der Aminosäuresequenz GSVDLQPSLIS enthält. Der Vektor verfügt über eine singuläre Erkennungssequenz am 5'-Ende der Gensequenz des Trägerproteins für die Restriktionsendonuklease BglII, wobei diese Schnittstelle für eine Fusion von Fremdgenen an das 5'-Ende der Lumazinsynthase genutzt werden kann.

34. Vektor zur Herstellung von Protein-Konjugaten nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Trägerproteingens vom Lumazinsynthase-Typs befindet, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich, einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ, und optional ein Linkerpeptid enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich und das Linkerpeptid sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Funktionsproteinbereich *in vivo* biotinyliert wird und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
- a) ein DNA-Fragment, kodierend für einen Trägerproteinbereich zur Ausbildung einer Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ (jeweils ohne Stop-Codon);
 - b) ein DNA-Fragment kodierend für ein biotinylierbares Peptid mit der Sequenz LGGIFEAMKMEWR, wobei die Aminosäure Lysin *in vivo* biotinyliert wird;
 - c) optional: ein DNA-Fragment, kodierend für ein Linkerpeptid.
35. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das Gen für die Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*, kodierend für den Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin enthält.
36. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das an die

Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für ein Tripeptid bestehend aus der Aminosäure Alanin enthält.

37. Ein Vektor nach Anspruch 34, gekennzeichnet dadurch, daß er das an die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für Peptid, bestehend aus der Aminosäuresequenz HHHAAA enthält.
38. Ein Vektor nach Anspruch 34 gekennzeichnet dadurch, daß er das an die Kodon-Verwendung von *Escherichia coli* angepasste Gen, kodierend für die Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* nach Anspruch 25 als Trägerproteinbereich, und als Linkerpeptid ein DNA-Fragment, kodierend für Peptid, bestehend aus der Aminosäuresequenz HHHHHHGGSGAAA enthält.
39. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält und wobei der Funktionsproteinanteil sich am N-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:
 - a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*;
 - b) Peptidkodierende DNA am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz MGDGAVQPDGGQPAVRNER
40. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12

gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält, wobei der Funktionsproteinanteil sich am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon),
- b) Peptidkodierende DNA am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz GDGAVQPDGGQPAVRNER.

41. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Anteil am 5'-Ende und am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet und der Funktions-DNA-Anteil für ein antigen wirksames Peptid aus dem VP2-Oberflächenprotein des 'Mink enteritis Virus' kodiert und das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinanteil und einen Trägerproteinanteil enthält, und wobei der Funktionsproteinanteil sich sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon).
- b) Zwei peptidkodierende Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Peptid am N-Terminus besitzt die Sequenz MGDGAVQPDGGQPAVRNER, das Peptid am C-Terminus die Sequenz GDGAVQPDGGQPAVRNER.

42. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12 gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet und der Funktions-DNA-Anteil für ein Oktapeptid (FLAG-Peptid) kodiert, welches durch einen monoklonalen Antikörper (vorzugsweise Anti-FLAG-M2; IBI E.coli FLAG®

Expression System, Integra Biosciences, Fernwald) erkannt wird, wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält und wobei sich der Funktionsproteinbereich am N-Terminus der Lumazinsynthase befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*;
- b) Peptidkodierende DNA am 5'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz MDYKDDDDK;
- c) DNA, kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz VKL.

43. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Anteil für ein Hexapeptid (His-6Peptid) kodiert, welches durch einen monoklonalen Antikörper (vorzugsweise Penta-HisTM Antibody; Quiagen, Hilden) erkannt wird, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält, und wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus der Lumazinsynthase befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* ohne Stopkodon.
- b) Peptidkodierende DNA am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens. Das Fremdpeptid besitzt die Sequenz HHHHHH.

44. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Bereich für eine artefizielle Peptidsequenz kodiert, die mit der Aminosäure Lysin endet, wobei die Aminosäure Lysin zur chemischen Kopplung von Funktionsmolekülen an den Trägerproteinbereich verwendet werden (vgl. Anspruch 16 b) kann, und wobei der Funktionsproteinbereich als Linker (Tentakel-Linker) dient, und wobei das fusionierte Gen für ein

artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält, wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis*.
- b) Kodon für Lysin (aaa) am 3'-Ende der artefiziellen DNA.
- c) DNA kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz GGGGSGGGSG.

45. Vektor zur Produktion eines Protein-Konjugates nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, daß sich der Funktions-DNA-Bereich am 3'-Ende des Lumazinsynthasegens aus *Bacillus subtilis* befindet, wobei der Funktions-DNA-Bereich für eine artefizielle Peptidsequenz kodiert, die mit der Aminosäure Cystein endet, wobei die Aminosäure Cystein zur chemischen Kopplung von Funktionsmolekülen an den Trägerproteinbereich verwendet werden (vgl. Anspruch 16 b) kann, wobei der Funktionsproteinbereich als Linker (Tentakel-Linker) dient, und wobei das fusionierte Gen für ein artefizielles Protein kodiert, welches einen Funktionsproteinbereich und einen Trägerproteinbereich enthält und wobei der Funktionsproteinbereich sich am C-Terminus des Trägerproteinbereichs befindet, und wobei der Vektor folgende Bestandteile enthält:

- a) Lumazinsynthasegen aus *Bacillus subtilis* (ohne Stop-Codon).
- b) Kodon für Cystein (tgc) am 3'-Ende der artefiziellen DNA.
- c) DNA kodierend für ein Linkerpeptid mit der Sequenz GGGGSGGGSGGG.

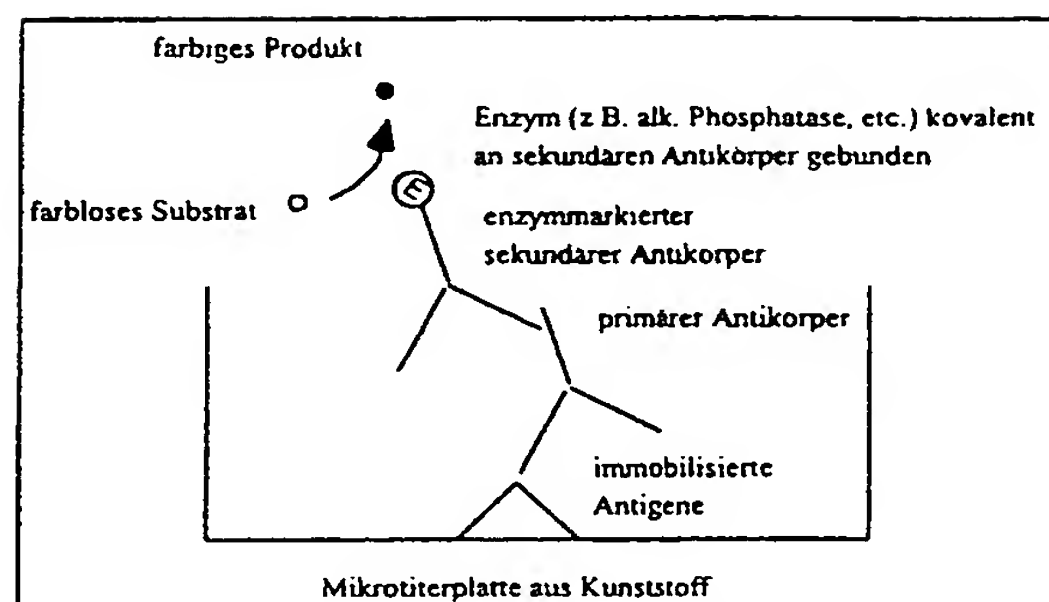
46. Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Anwendung als Arzneistoff oder Impfstoff.

47. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels oder eines Impfstoffs.

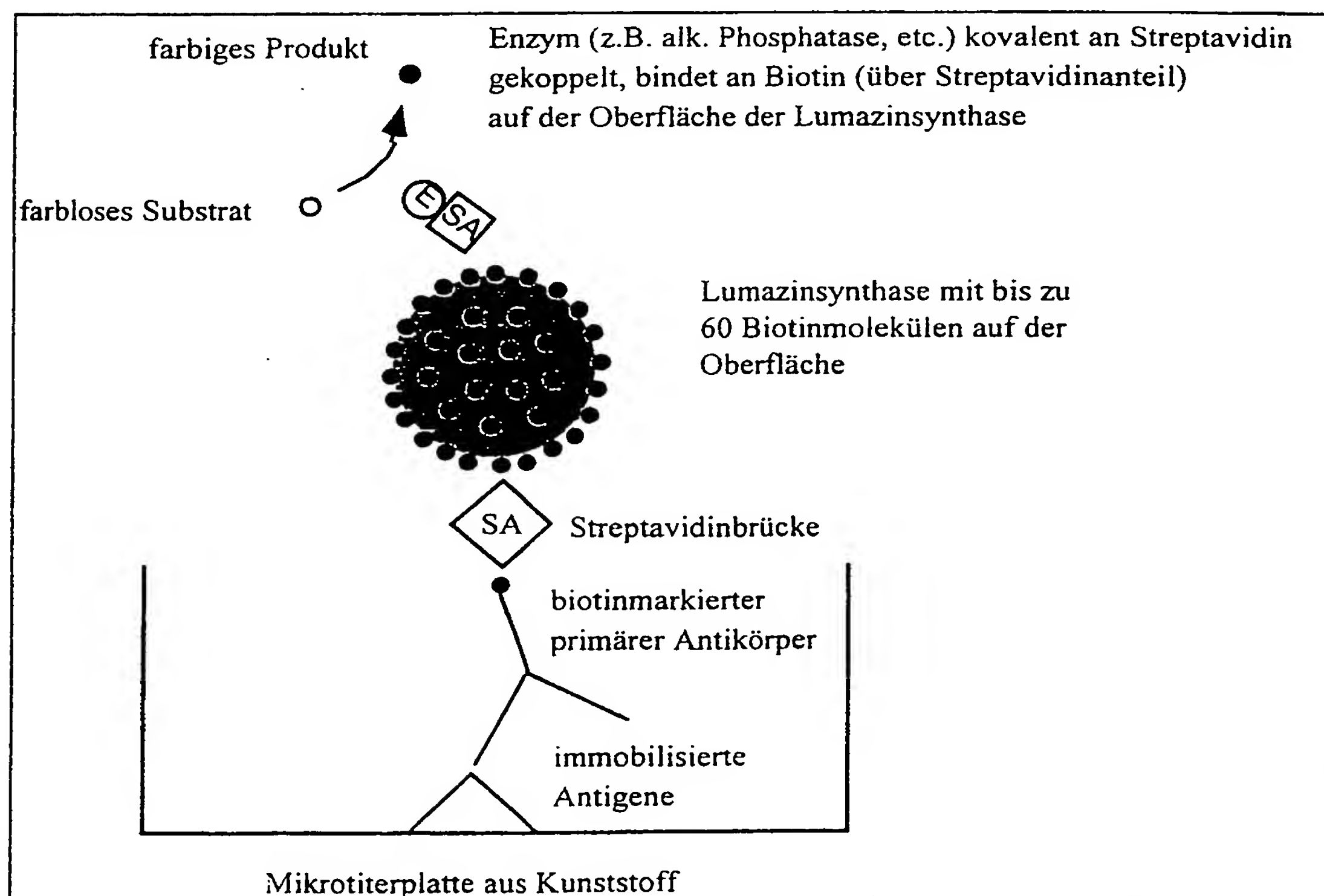
48. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung von diagnostisch oder therapeutisch verwendbaren Antikörpern.

49. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur selektiven Detektion von Antikörpern oder zur Reinigung von Antikörpergemischen oder zur Charakterisierung von Antikörpern.
50. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung von Proteinbibliotheken.
51. Arzneimittel, enthaltend eine pharmakologisch wirksame Menge eines Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
52. Impfstoff, enthaltend eine immunologisch wirksame Menge eines Protein-Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
53. Verwendung der Protein-Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 15 als Biosensor.

Figuren

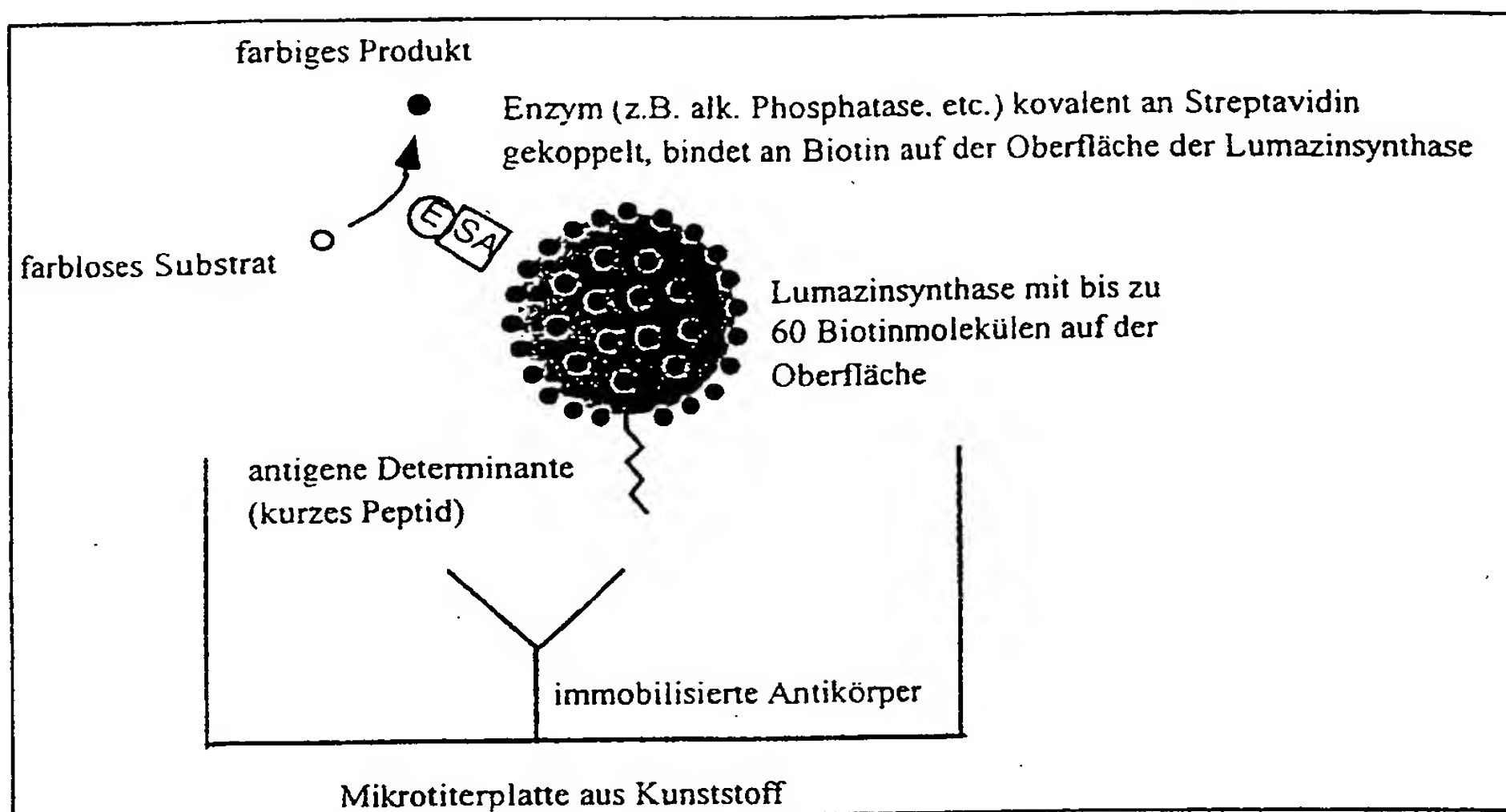


Figur 1

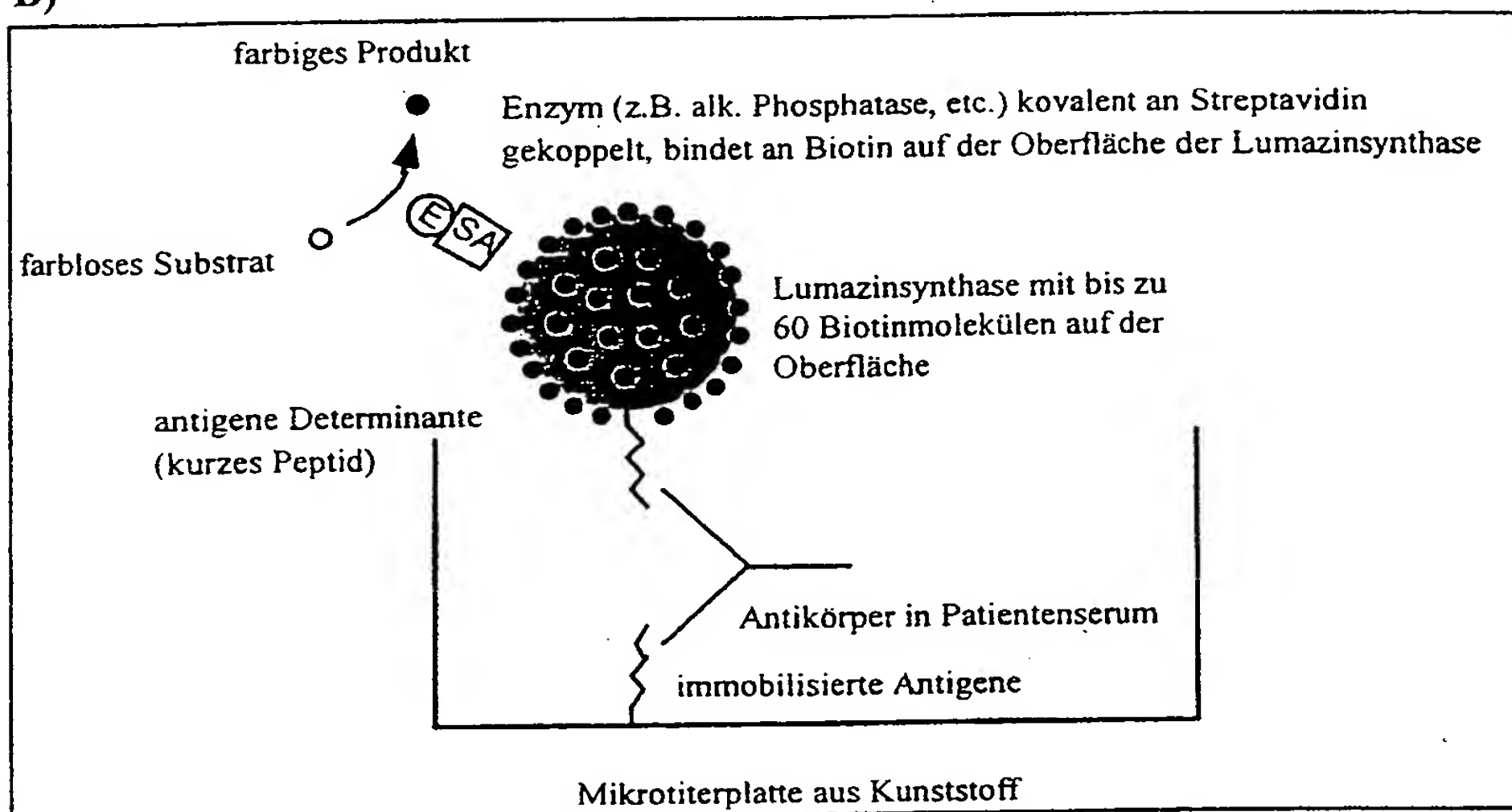


Figur 2

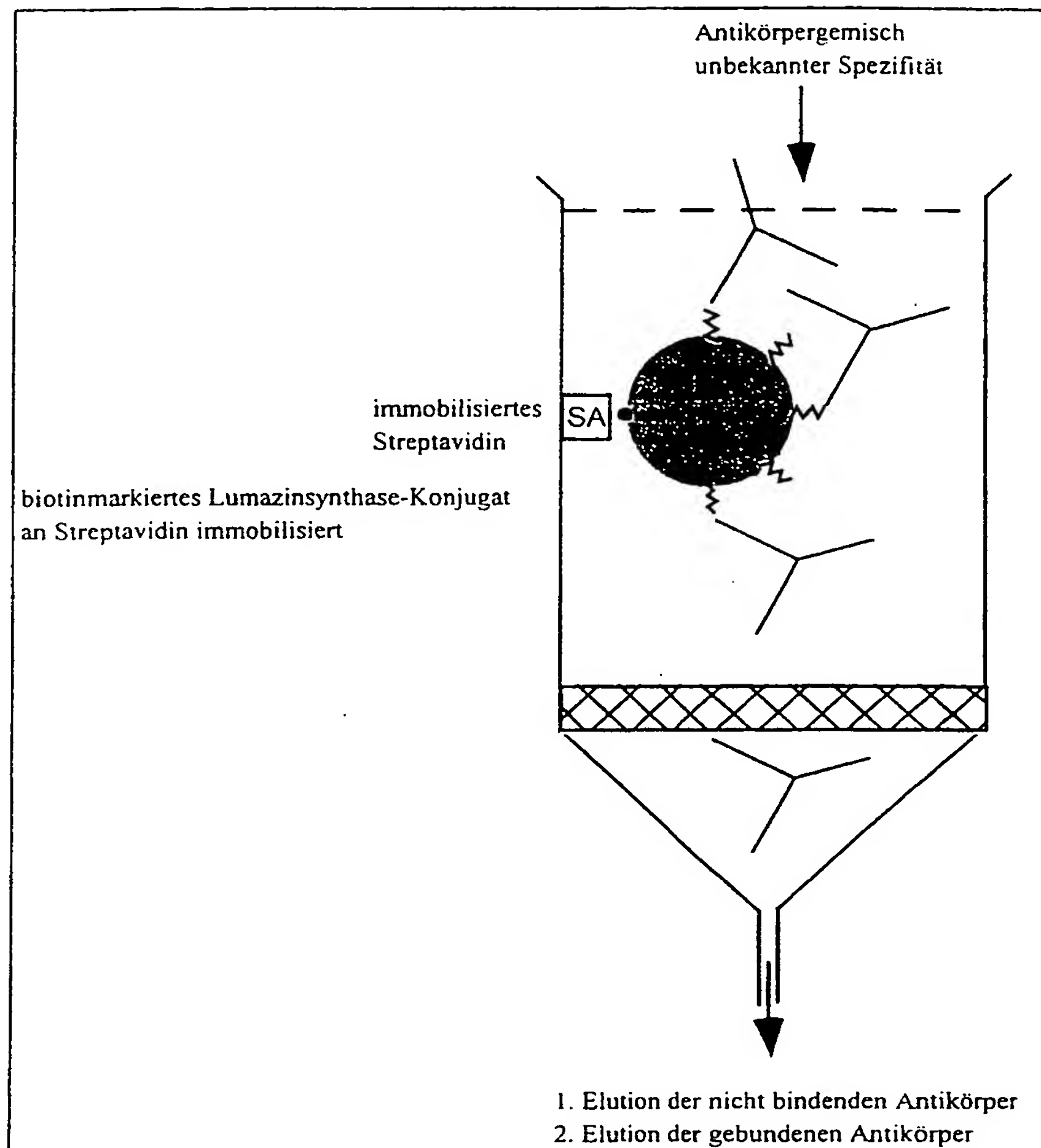
A)

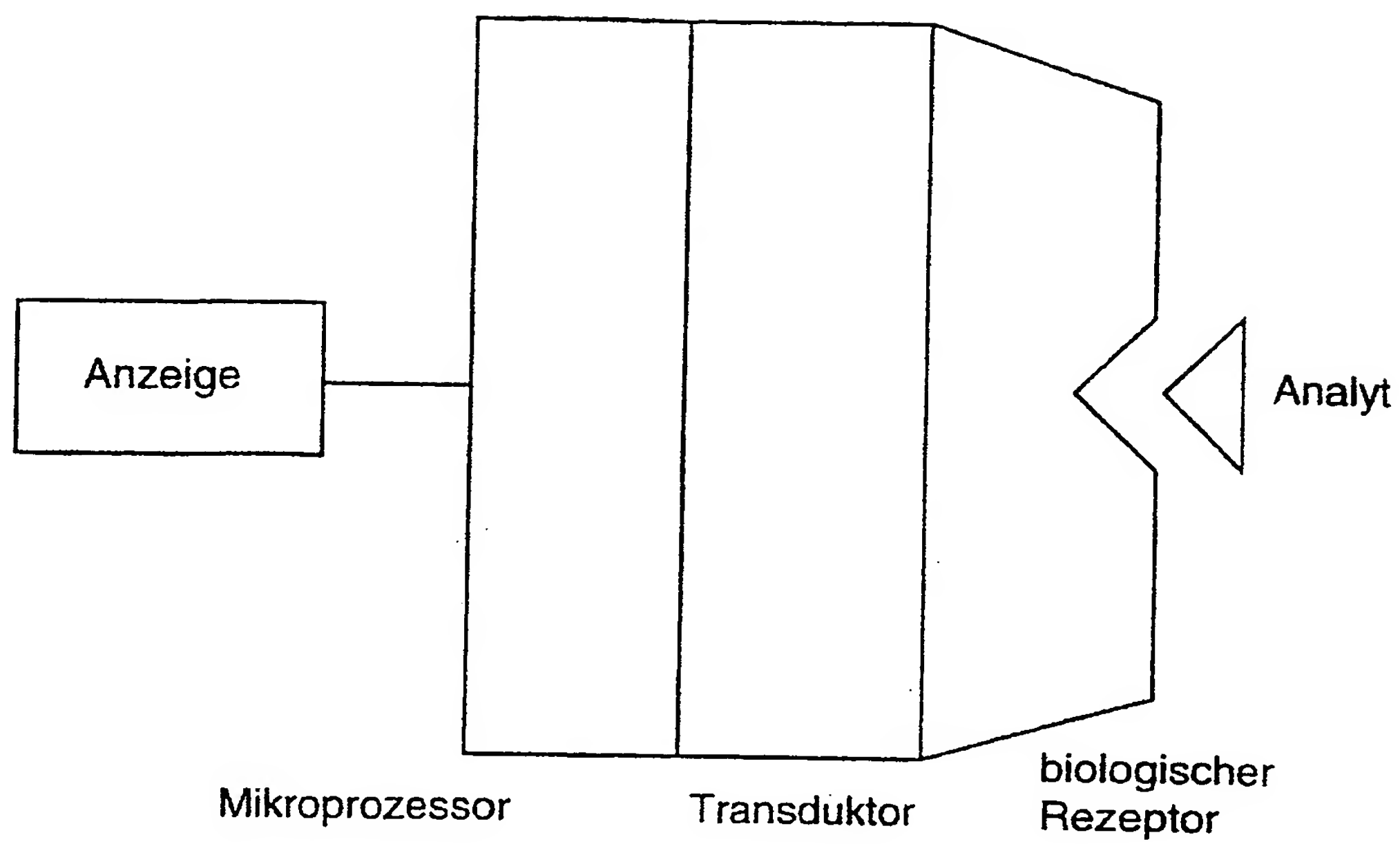


B)

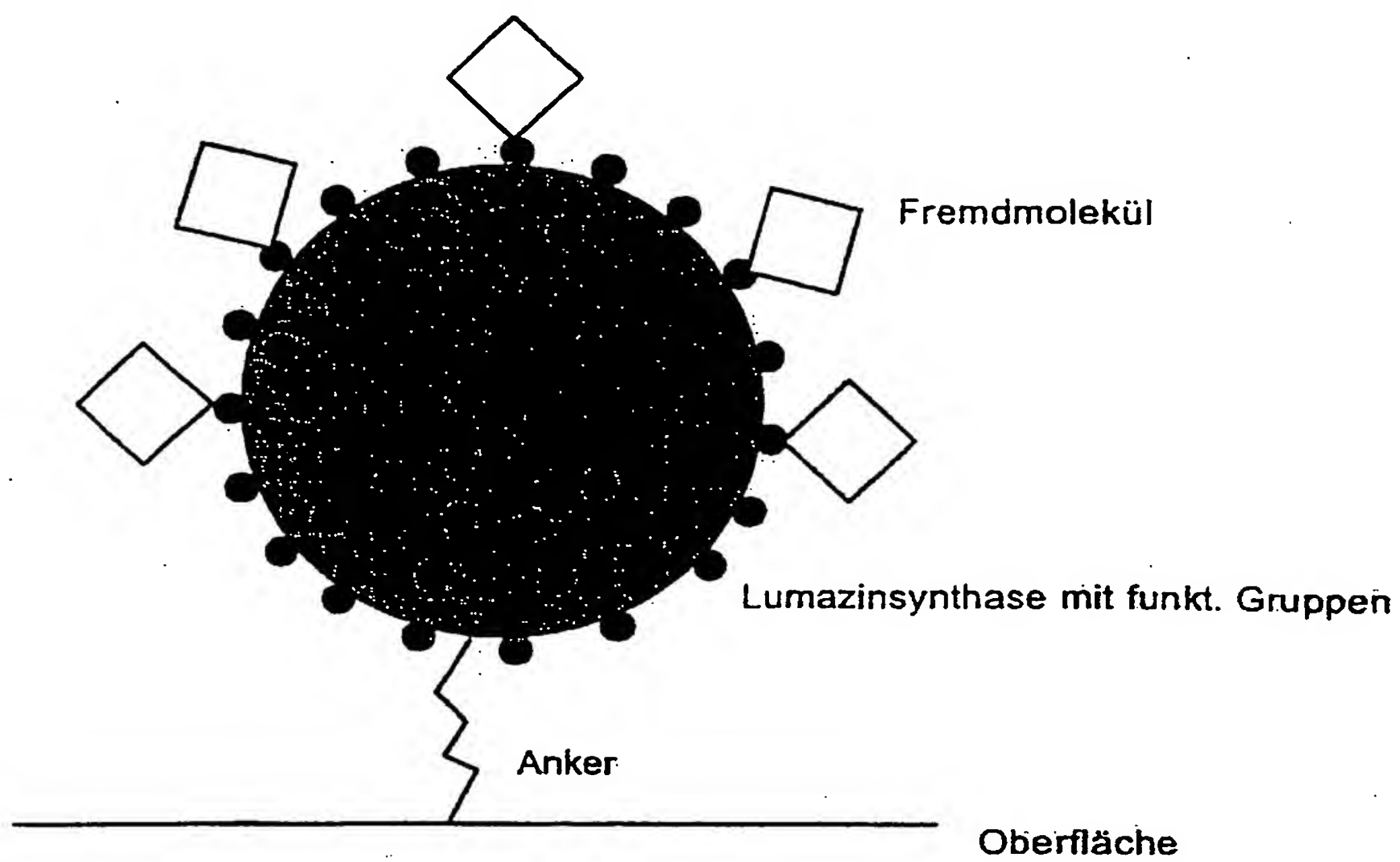


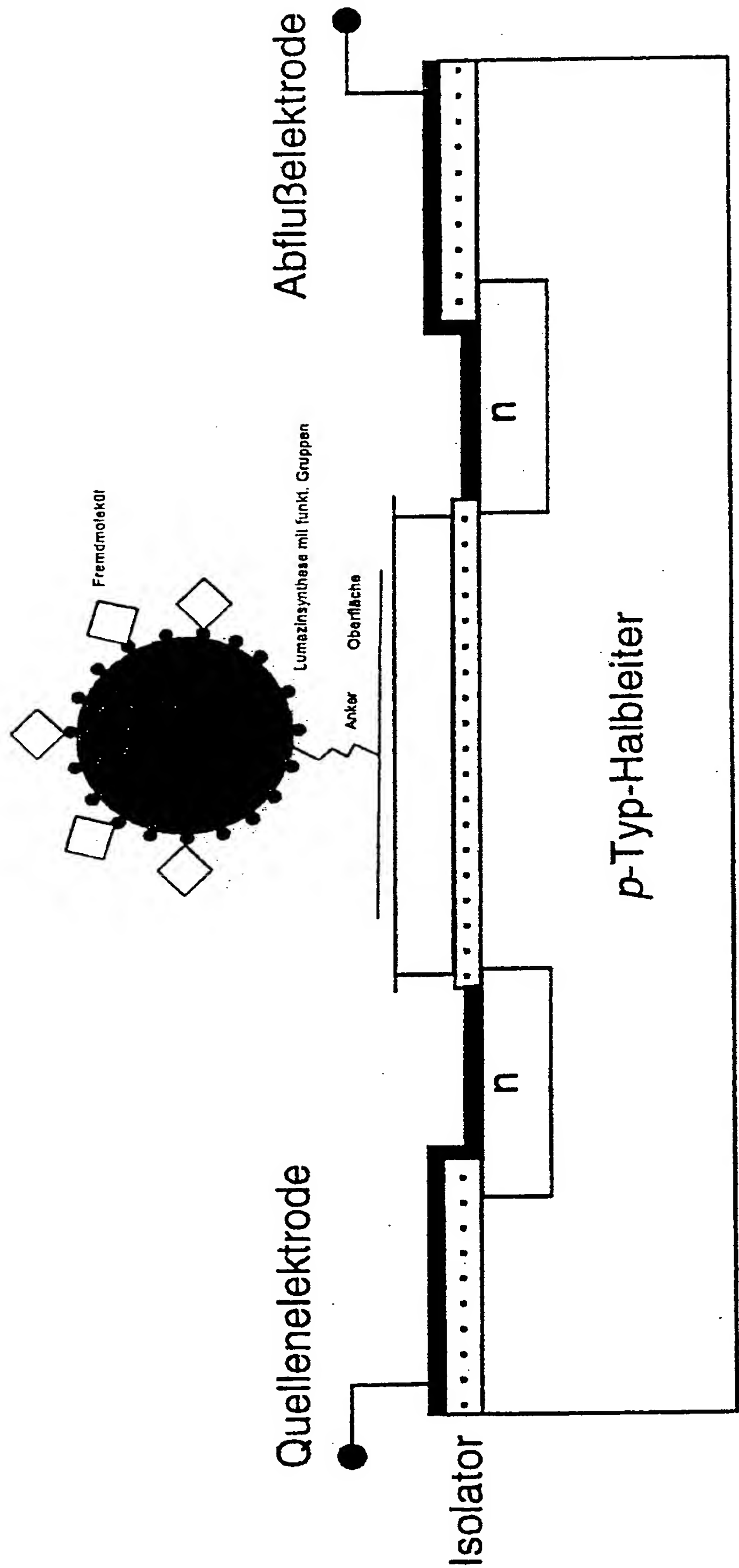
Figur 3

**Figur 4**



Figur 5

**Figur 6**



Figur 7

Seite 1

1	M. avium	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
2	M. tuberculosis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MSPAAGVP	EMPALDASG-VRLGI	22
3	C. ammoniagenes	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MP	DLPSLOASG-VRLAI	16
4	C. tepidum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MS-KEGLP	EVATIDATG-ISVAV	21
		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MQVQNI	EGSLN-ASG-LKFAL	19
5	A. aeolicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MQIY	EGKLT-AEG-LRFGI	17
6	T. maritima	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKVV	QGDYR-GEG-LKIAV	17
7	B. subtilis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNII	QGNLV-GTG-LKIGI	17
8	B. amyloliquefaciens	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNII	QGNLV-GTG-LKIGI	17
9	A. pleuropneumoniae	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MAKI	TGNLV-ATG-LKFGI	17
10	S. pneumoniae	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNTY	EGNLV-ANN-IKIGI	17
11	S. aureus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MN-F	EGKLI-GKD-LKVAI	16
12	V. cholerae	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKVI	EGGFP-APN-AKIAI	17
13	P. phosphoreum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKVI	EGAIV-APN-AKVAI	17
14	S. putrefaciens	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNVV	QGNIE-AKN-AKVAI	17
15	P. leiognathi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKLL	KG-VD-CTS-CCIAI	16
16	S. flexneri	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNII	EANVA-TPD-ARVAI	17
17	E. coli	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNII	EANVA-TPD-ARVAI	17
18	H. influenzae	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKVL	EGSVA-APN-AKVAV	17
19	D. multivorans	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNIV	EGKLS-LNGDEKVAI	18
20	H. pylori	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MQII	EGKLQ-LQGNERVAI	18
21	D. radiodurans	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MQRI	EATLL--AHDLKFAI	17
22	Synechocystis-sp.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MTVY	EGSETPPARPERFAL	19
23	P. gingivalis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MATAYHNLSDD	YESVPCGKD-LRIGI	26
24	A. thaliana	MKSLASPPCLRLIPT	AHRQLNSRQSSACY	IHGSSVKNKSNLSE	SSSTSGFASPLAVEK	ELRSSFVQTAARHV	TGSLIRGEG-LRFAI					89
25	M. jannaschii	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MVLMLNLGF	9
26	A. fulgidus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MEKVKLG	8
27	M. thermoautotrophicum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKKVRIGA	8
28	C. trachomatis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MKPL	KGCFV-AKD-VRVAI	17
29	S. cerevisiae	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MAVKGLG	KPDQVYDGSKIRVGI	22
30	B. abortus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----MNQSCPNTSEKIAE	15

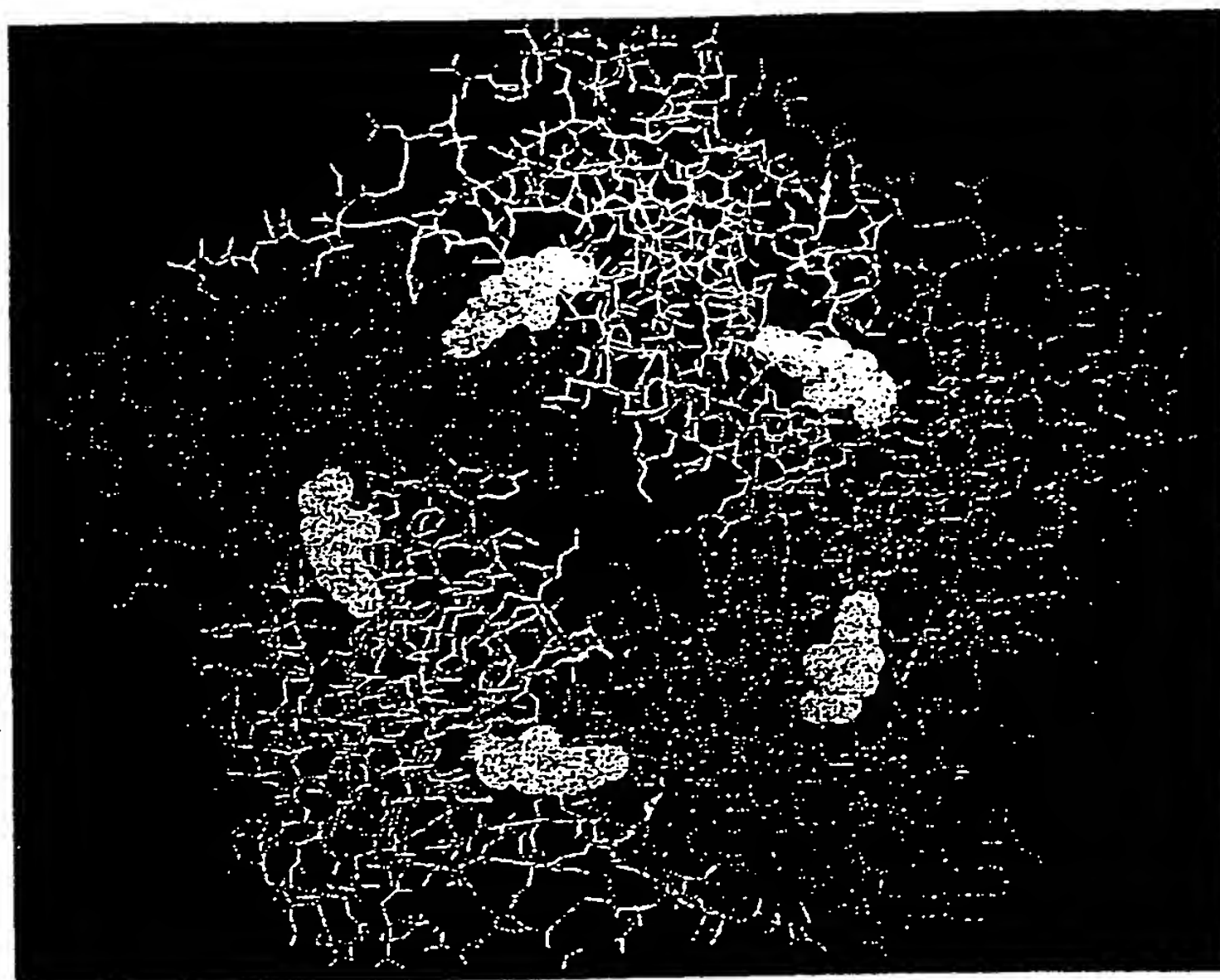
Seite 2

1	M. avium	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	99
2	M. tuberculosis	VASTWHSRICDALLA	GARKVAADSGVENPT	V-----VRVLGAIE	IPVVAQELAR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	NHDAVVALGVVIR	QOTPHFEYVCDVATQ
3	C. ammoniagenes	VASSWHGKICDALLD	GARKVAAGCGLDDPT	V-----VRVLGAIE	IPVVAQELAR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	NHDAVVALGVVIR	QOTPHFDYVCDVATQ
4	C. tepidum	ISATWNADICDRLHE	RALAHAAQQLGAEDG	-----FRVVGALE	IPVAVQEAAR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	HYDAVVALGCVIR	GGTPHFDYVCDVATQ
		VVSRFNDFIGQKIVE	GAIDCIVRHG-GSAD	---EITVIRCPGAFE	LPSVTRKAMLS	----	----	----	----	----	----	----	GKYDAIVTLGVIR	GSTPHFDYVIAAEATK
5	A. aeolicus	VASRENHALVDRIVE	GAIDCIVRHG-GREE	---DITLVVRVPGSWE	IPVAAAGELARK	----	----	----	----	----	----	----	EDIDAVIAIGVLIR	GATPHFDYVIASEVSK
6	T. maritima	VVPRENDLVTSKLLS	GALDGLKRHG-VSDE	---NITVVRIPGSME	AIYTLKRLLDL	----	----	----	----	----	----	----	GVHDAIIVLGAVIR	GETYHFNVVANEIGK
7	B. subtilis	VVGRENDFITSKLLS	GAEDALLRHG-VDTN	---DIDVAVVPGAFE	IPFAAKKMAET	----	----	----	----	----	----	----	KKYDAIITLGTVIR	GATTHYDYVCNEAAK
8	B. amyloliquefaciens	VVGRENDFITSKLLS	GAEDTLIRHG-VESN	---DIDVAVVPGAFE	IPFAAKKMAET	----	----	----	----	----	----	----	KKYDAVITLGTVIR	GATTHYDYVCNEAAK
9	A. pleuropneumoniae	VTARENDFINDKLLS	GAIDTLVRHG-AYEN	---DIDTAWVPGAFE	IPLVAKKMANS	----	----	----	----	----	----	----	GKYDAVICLGTVIR	GSTTHYDYVCNEAAK
10	S. pneumoniae	VVARENEFITSKLLS	GALONLKREN-VNEK	---DIEVAVVPGAFE	IPLIASKMAKS	----	----	----	----	----	----	----	KKYDAIICLGTVIR	GNTSHYDYVCSEVSK
11	S. aureus	VVSRENDFITGRLLS	GAIDTLIRHD-VNED	---NIDVAFVPGAFE	IPLVAKKLASS	----	----	----	----	----	----	----	GNYDAVITLGTVIR	GATSHYDYVCNEVAK
12	V. cholerae	VISRENSFINESLLS	GAIDTLKRHGQISDD	---NITVVRCPGAVE	LPLVAQRVAKT	----	----	----	----	----	----	----	GKYDAIVSLGCVIR	GGTPHFDYVCSEMNK
13	P. phosphoreum	VIARENSFINESLLS	GALDTLKRQGVSYD	---NITIIRCPGAYE	LPLVAQLTAKS	----	----	----	----	----	----	----	DRYDAIIALGCVIR	GGT-HFEYVASECNK
14	S. putrefaciens	VISRENSFELVESLLE	GALDTLKRFGQVSDE	---NITVVRVPGAVE	LPLAARRVAAS	----	----	----	----	----	----	----	GKFDGIIALGAVIR	GGTPHFEVAGECNK
15	P. leleognathi	VIARENSFINENLLS	GAINALQRKGQVKA	---NITVIRCPGAYE	LPLAAQQAQAKQ	----	----	----	----	----	----	----	GNYDAIIALGAVIR	GGTPHFEVAGECNK
16	S. flexneri	TIARENFINDSLE	GAIDALKRIGQVKDE	---NITVVRVPGAYE	LPLAAGALAKT	----	----	----	----	----	----	----	GKYDAVIALGTVIR	GGTAHFEYVAGGASN
17	E. coli	TIARENFINDSLE	GAIDALKRIGQVKDE	---NITVVRVPGAYE	LPLAAGALAKT	----	----	----	----	----	----	----	GKYDAVIALGTVIR	GGTAHFEYVAGGASN
18	H. influenzae	VIARENSFINESLLE	GAIDALKRIGQVKDE	---NITVVRVPGAYE	LPLAARRLAES	----	----	----	----	----	----	----	KKFDALVALGTVIR	GGTAHFEYVAGEASS
19	D. multivorans	INARENHIIITDRIVE	GARDAYLRHG-GKDE	---NLDLVLPVPGAFE	IPMALNRLAC	----	----	----	----	----	----	----	SKYDAVCCCLGAVIR	GSTPHFDYVSAEVTK
20	H. pylori	LTSRENFIIITDRLOE	GAMDCFKRHG-GDED	---LDDIVLPVPGAYE	LPFILDKLLS	----	----	----	----	----	----	----	EKYDGVVCLGAVIR	GGTPHFDYVSAEATK
21	D. radiodurans	VSTRWNHLIVDRIVE	GAELAEVQHGGKTEN	---LDHFLVPGSFE	VPLVARRLAET	----	----	----	----	----	----	----	GRYDAVVCCLGAVIR	GDTDHYDFVAGGAAN
22	Synechocystis-sp.	VIARENDLVTEKLLS	GCQDCLKRHGIDVDP	AGTQVDYIWPVGSFE	VPLVTRKLAVS	----	----	----	----	----	----	----	GQYDAIICLGTVIR	GOTPHFDYVAGEAAK
23	P. gingivalis	AVAEWNHNITEPLMK	GAIDTLLEHG-VSAD	---NIIIVQHVPGTFF	LYASAYLAEQ	----	----	----	----	----	----	----	HEVDAVIAIGCVIR	GOTPHFDYICQGVTO
24	A. thaliana	VVARENEVVTKLLLE	GAIDTEFKKYS-VREE	---DIEVIWVPGSFE	IGVVAQNLGKS	----	----	----	----	----	----	----	GKFHAVLCIGAVIR	GDTTHYDAVANSAAK
25	M. jannaschii	VIAEFNRDITYMMEK	VAEEHAEFLGATVKY	---KIVVPGVFD	MPLAVKKLLEK	----	----	----	----	----	----	----	DDVDAVVTIGCVIE	GETEHDEIVVHNAAR
26	A. fulgidus	VVAFENRDITYMMEI	LGKEHAEFLGAEVSE	---VIRVPGTFF	IPIAVKKMLEK	----	----	----	----	----	----	----	GRVDAVVAIGCVIE	GETEHDEIVAQHAAR
27	M. thermoautotroph.	VVAFENYDITHMMEI	LAKEHARFLDAEITR	---VIAVPGVFD	MPLAVKKLLE	----	----	----	----	----	----	----	DEIDAVITLGTVIE	GATDHDQIVVQHASR
28	C. trachomatis	VGSCFNSPIADRLVA	GAQETFFDFGGDPSS	---LTIVRVPAGE	IPCAIKKLLSTS	----	----	----	----	----	----	----	GQFHAVVACGVLIQ	GETSHYEHIADSVAA
29	S. cerevisiae	IHARWNRVVIDALVK	GAIERMVSIG-VEEK	---NIIETVPGSFE	LPWGTKRFEVDROAKL	----	----	----	----	----	----	----	GKPLDVVPIGVLK	GSTMHFEYISDSTH
30	B. abortus	IQARWHADIVDEARK	SFVAELAAKTGGSVE	---VEIFDVPAGE	IPLHAKTLART	----	----	----	----	----	----	----	GRYAAIVGAAFVID	GGIYRHDFVATAVIN

Seite 3

1	M. avium	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
2	M. tuberculosis	GITRVSLDASTPVAN	GVLTTDNEQQALDRA	GLPDSA--EDKGAQA	AGAALSAALTRELR	ARS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	160
3	C. ammoniagenes	GLTRVSLDSSSTPIAN	GVLTTNTEEQALDRA	GLPTSA--EDKGAQA	TVAALATALTRELR	AHS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	154
4	C. tepidum	GLTRIALDTSKPIAN	GVLTVNTHDQAVDRS	GAPGAA--EDKGVEA	MQAALDTVQLRNIK	ERASKRGL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	163
		GIAQVGMEAAIPVSF	GVLTTENLEQAIAERA	GTKAG----NKGFEA	ALAAIEMANLYKQL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	155
5	A. aeolicus	GLANLSLELRKPITF	GVITADTLEQAIAERA	GTKHG----NKGWEA	ALSAIEMANLFKSLR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	154
6	T. maritima	AVAQFNMTSDIPIVF	GVLTTDTLEQALNRA	GAKSG----NKGFEA	AMVAIEMANLRKRLR	RDVFESDSNGR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	165
7	B. subtilis	GIAQAANTTGVPIVF	GIVTTENIEQAIAERA	GTKAG----NKGVDC	AVSAIEMANLNRSEF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	154
8	B. amyloliquefaciens	GIAQAGTATGVPVIF	GIVTTETIEQAIAERA	GTKAG----NKGADC	AVSAIEMANLNRSEF	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	154
9	A. pleuropneumoniae	GIGAVALETGVPIVF	GVLTTENIEQAIAERA	GTKAG----NKGSEC	ALGAIEIVNVLKAI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	153
10	S. pneumoniae	GIAQISLNSEIPVMF	GVLTTDTIEQAIAERA	GTKAG----NKGSEC	AQGAIEMVNLIRTL	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	155
11	S. aureus	GVSKVNDQTNVPVIF	GILTTESIEQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	AVSAIEMANLLKSIK	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	154
12	V. cholerae	GLAQVSLFESIPVAF	GVLTVDTIDQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	ALSAIEMANLSEID	S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	156
13	P. phosphoreum	GLAQVALDYNIPVAF	GVLTVDYLEQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	ALMLLEMVNILAQVE	S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	155
14	S. putrefaciens	GLAQIALEFDLPVAF	GVLTTDTIEQAIAERS	GTKAG----NKGGEA	ALSLLSEMNVNVLQLE	QQL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	158
15	P. leiognathi	GLAQVALEYQTPVAF	GVLTVDSIEQAIAERA	GTKMG----NKGEEA	ALSAL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	144
16	S. flexneri	GLAHVAQDSEIPVAF	GVLTTESIEQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	ALTAIEMINVLKAIK	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	156
17	E. coli	GLAHVAQDSEIPVAF	GVLTTESIEQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	ALTAIEMINVLKAIK	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	156
18	H. influenzae	GLGKVMADAEIPVAF	GVLTTENIEQAIAERA	GTKAG----NKGAEA	ALTAIEMVNLIQIID	AA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
19	D. multivorans	GVANVALQFAKPVAF	GVLTVDSIEQAIAERA	GSKAG----NKGFEA	MVTVIELLSLYSALK	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	156
20	H. pylori	GIAHAMLYKSMVPVSF	GVLTTDNIEQAIAERA	GSKAG----NKGFEA	MSTLIELLSLCQTLK	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	156
21	D. radiodurans	GILNTSLHTGVPVAF	GVLTTDTVEQALNRA	GIKAG----NKGGEA	VAMIETANLLKQIE	R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	155
22	Synechocystis-sp.	GIAAIASQTGVPVIF	GILTTDTMQQALERA	GIKS-----NHGWGY	AMNALEMASLMRAMA	PLTEG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	164
23	P. gingivalis	GITQLNIDGFPVPIF	GVLTTETMLQAEERA	GKKGH----NKGTEA	AVTALKMAGLERI	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	161
24	A. thaliana	GVLSASINSVPCIF	GVLTCEDMDQALNRS	GKAG----NKGAE	ALTAIEMASLFEHL	K	-----	-----	-----	-----	-----	-----	227
25	M. jannaschii	KIADLALQYDKPVT	GISGPG-MTRLQAE	RVDYG----KRAVEA	AVKMKVRLKALEE	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	141
26	A. fulgidus	KIMDLSEYKGPVT	GISGPG-MGRIAATE	RVDYA----KRAVEA	AVKLVKRLKEYDAEG	S	-----	-----	-----	-----	-----	-----	143
27	M. thermoautotroph.	KIADLALDYDKPVAL	GISGPG-MTRLEAHQ	RVDYA----KRAVEA	AVKMYRRLKEDI	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	139
28	C. trachomatis	GVSRSLDFCLPITF	SVITAPNMEAWEA	GIKGP----NLGASG	MKTALEMASLFLSLIG	KE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
29	S. cerevisiae	ALMNLQEKVDMPIVF	GLLTCMTEEQALARA	GIDEAHSMHNGEDW	GAAAVEMAVKEGKNA	F	-----	-----	-----	-----	-----	-----	169
30	B. abortus	GMMQVQLETEVPVLS	VVLTPHHEHESKEHH	DEFFHAH-FKVKGVEA	AHAALQIVSERSRIA	ALV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	158

Figur 8

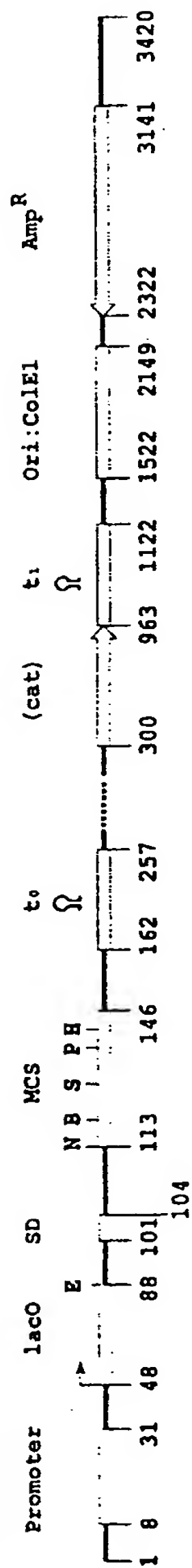


Figur 9

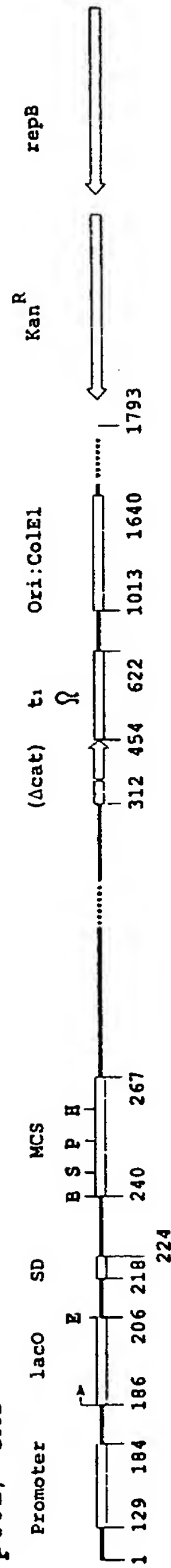


Figur 10

pNC0113



p602/-CAT



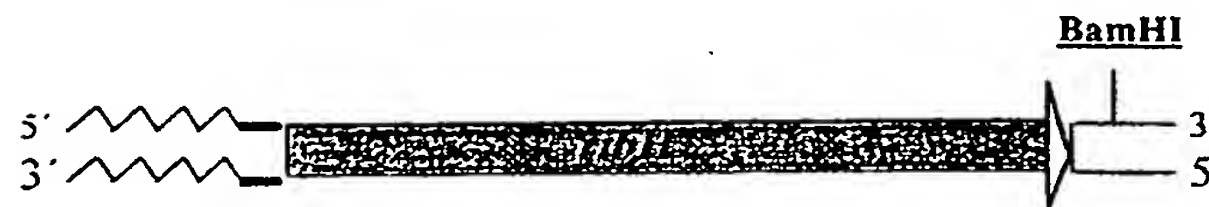
Figur 11

- 1. PCR** (dNTP's; Oligonukleotide PNCO-M1/C93S und PNCO-M2/RibH-3; *PNCO-BS-Lusy* (Matrizen-DNA für die PCR); Taq-Polymerase)

PNCO-M1/C93S [Fragment-A]

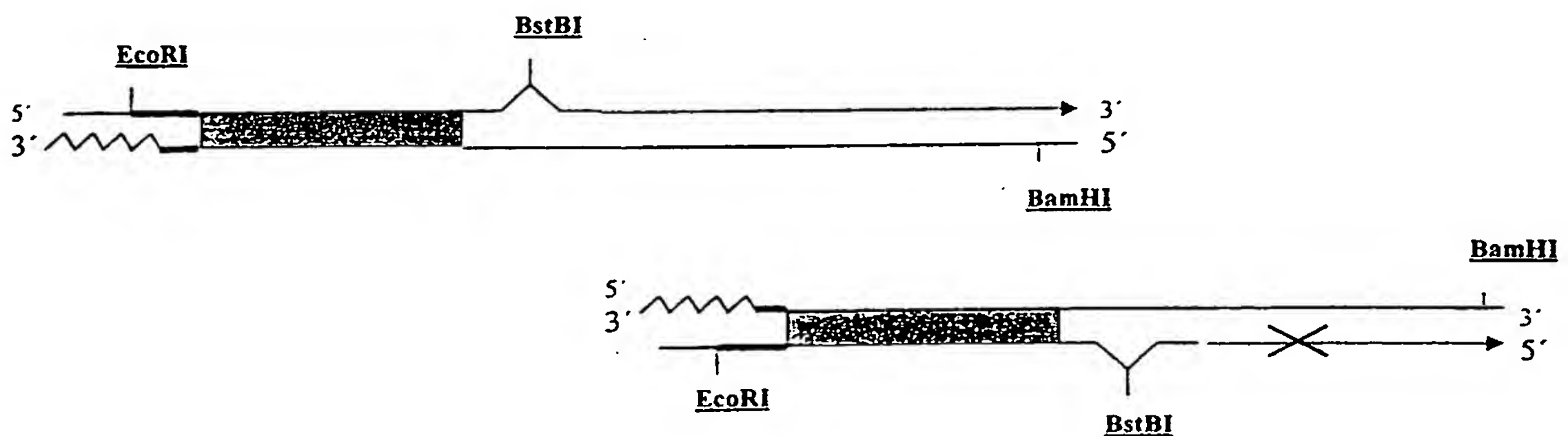


PNCO-M2/RibH-3 [Fragment-B]



Figur 12

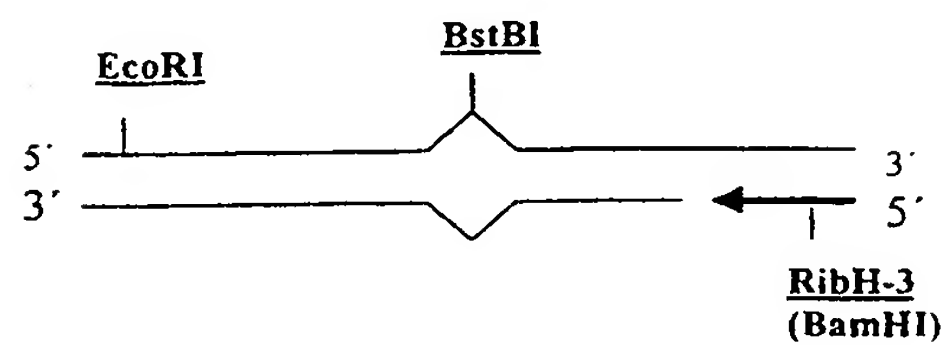
- 2. PCR** (dNTP's; Fragment A und Fragment B der 1. PCR; Taq-Polymerase)



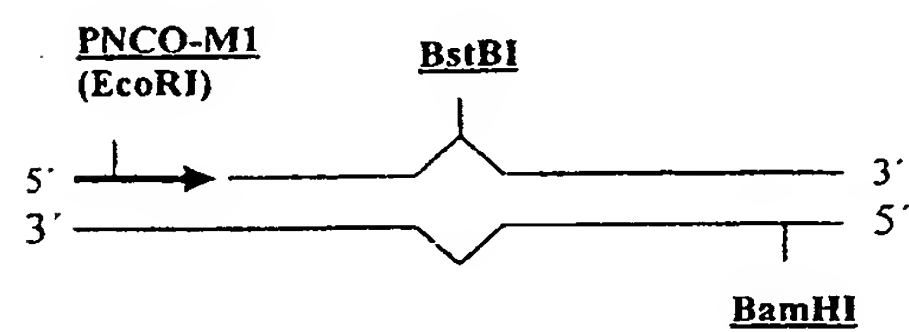
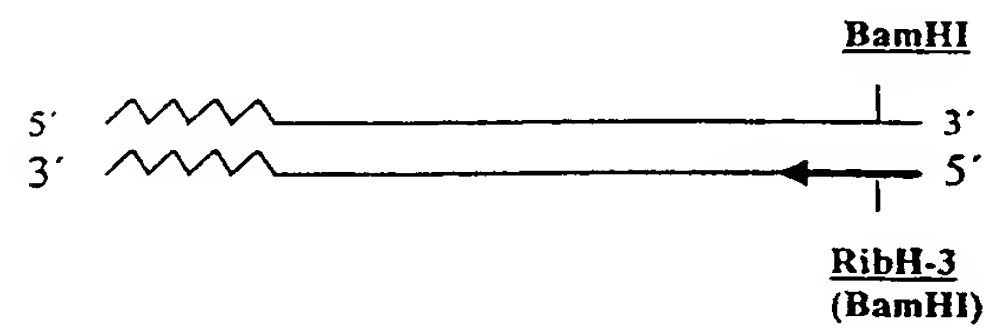
Figur 13

3. PCR (dNTP's; Produkt der 2. PCR; Oligonukleotide PNCO-M1/RibH-3; Taq-Polymerase)

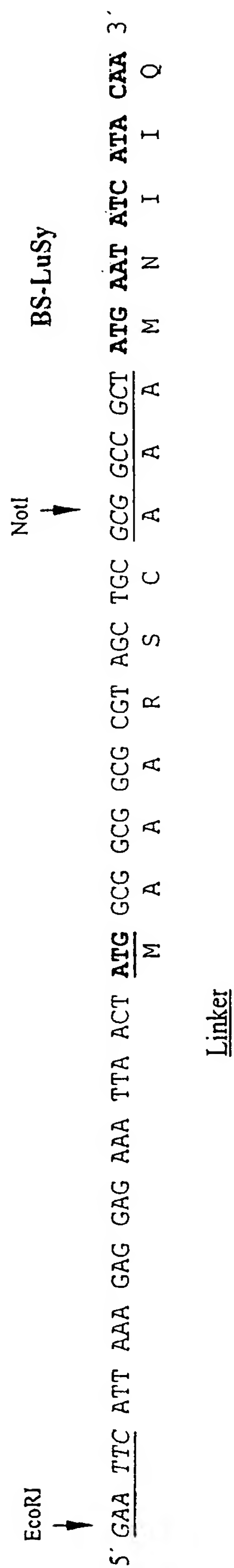
exponentielle Amplifikation



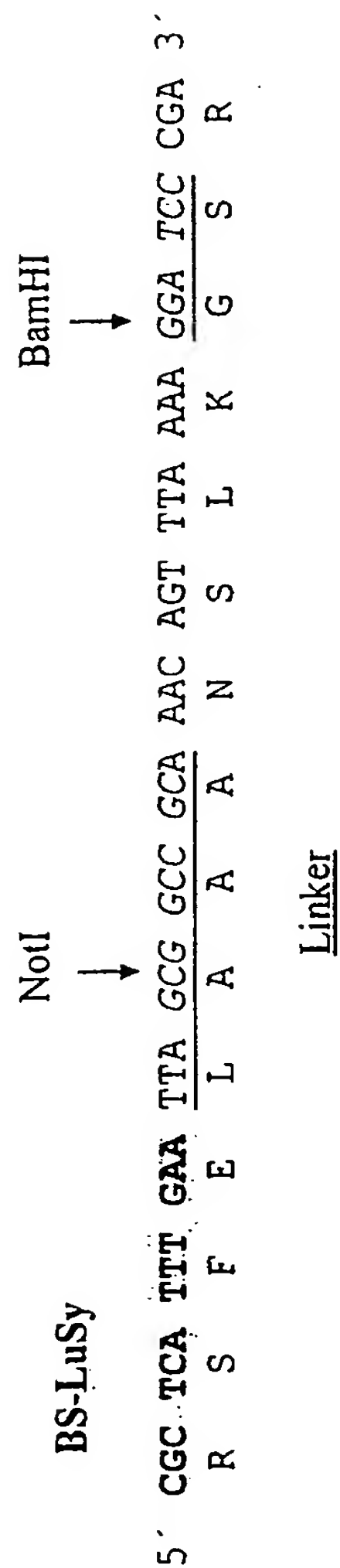
lineare Amplifikation



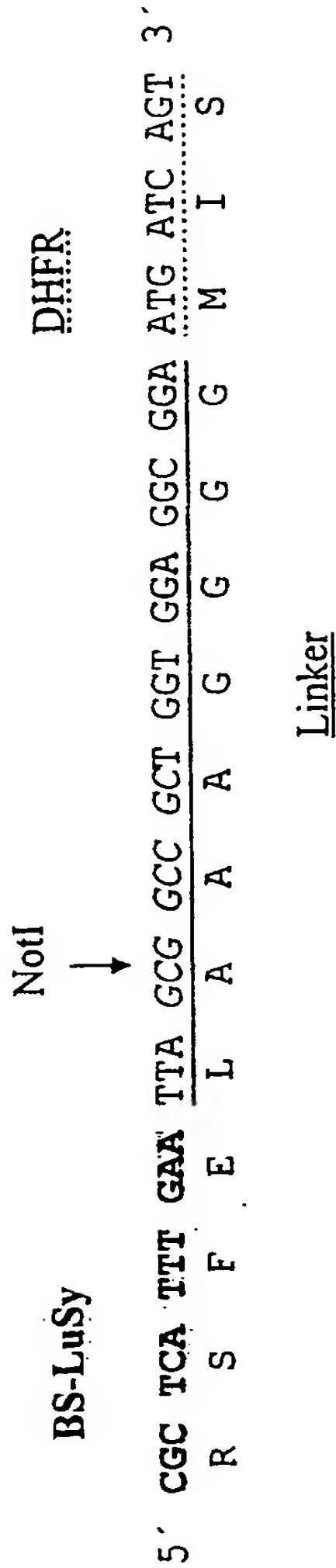
Figur 14



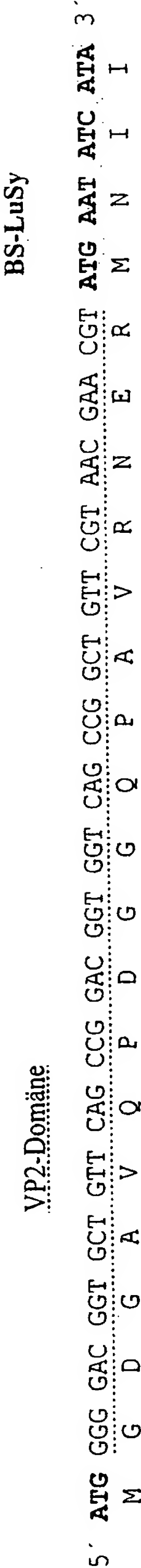
Figur 15



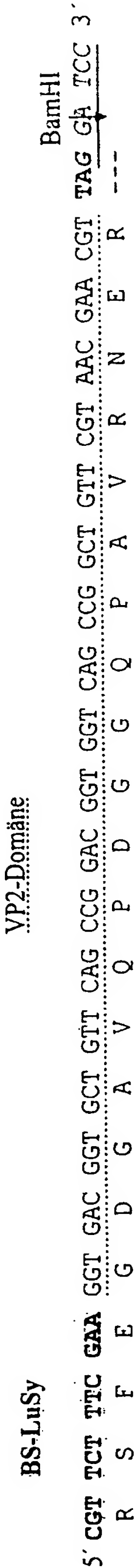
Figur 16



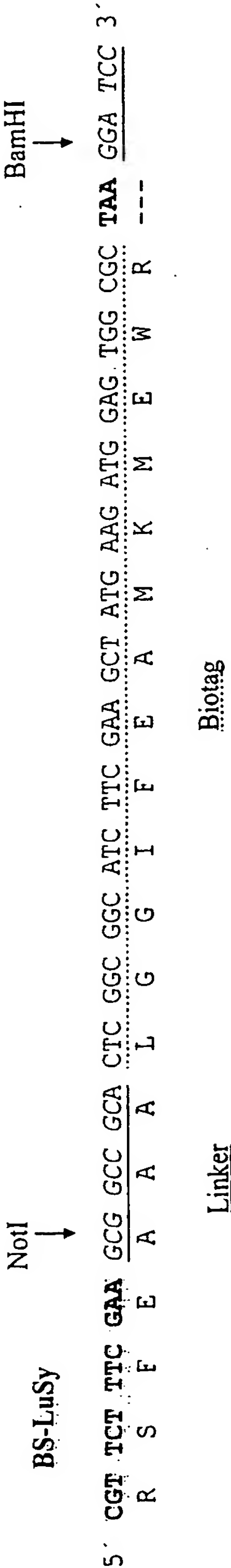
Figur 17



Figur 18

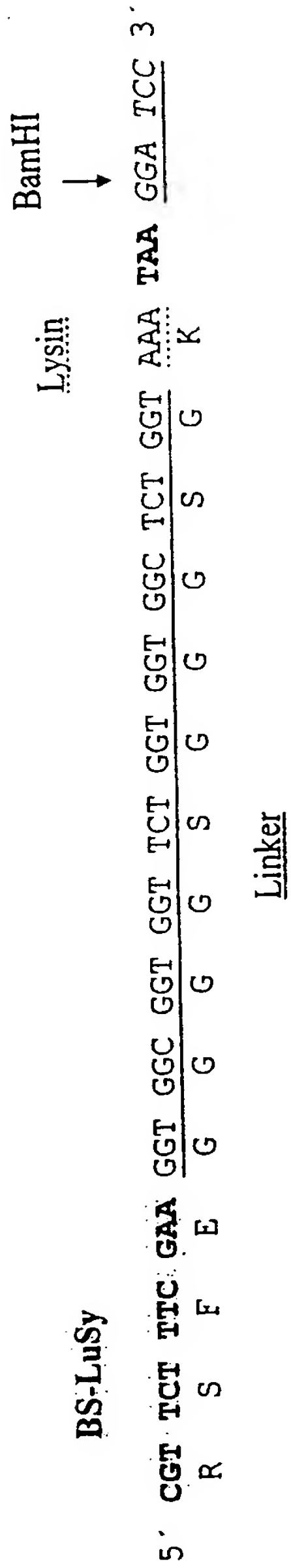


Figur 19

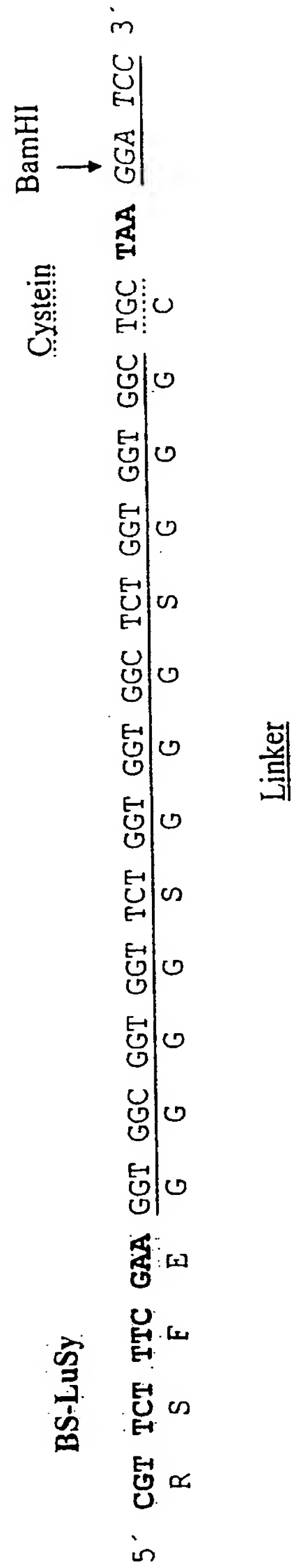


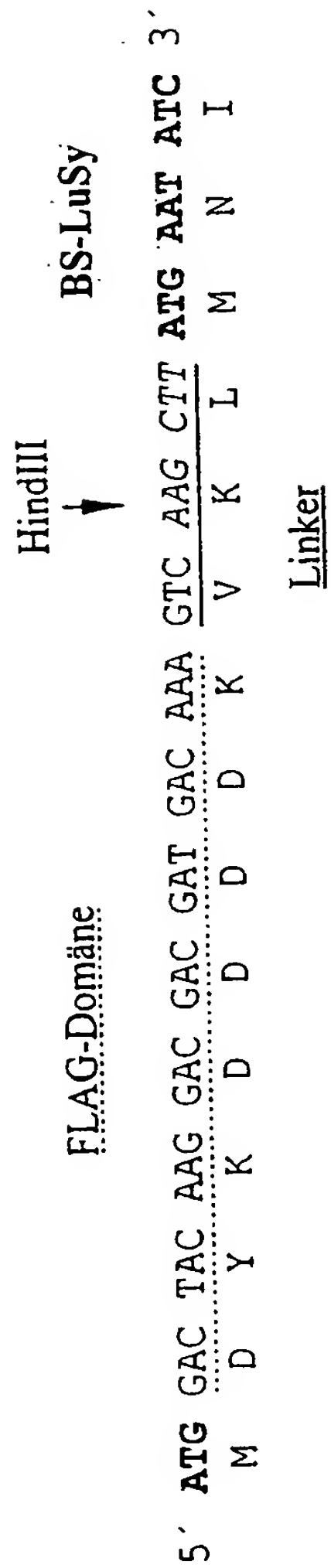
Figur 20

Figur 21

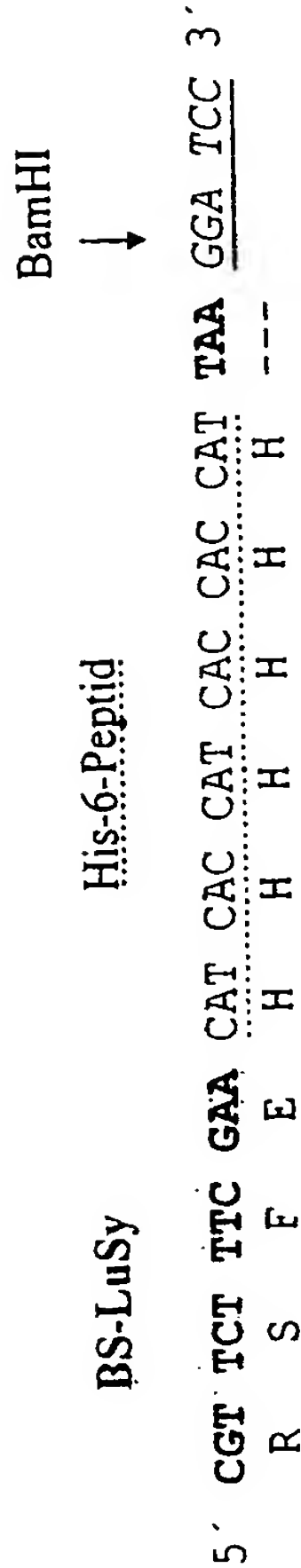


Figur 22

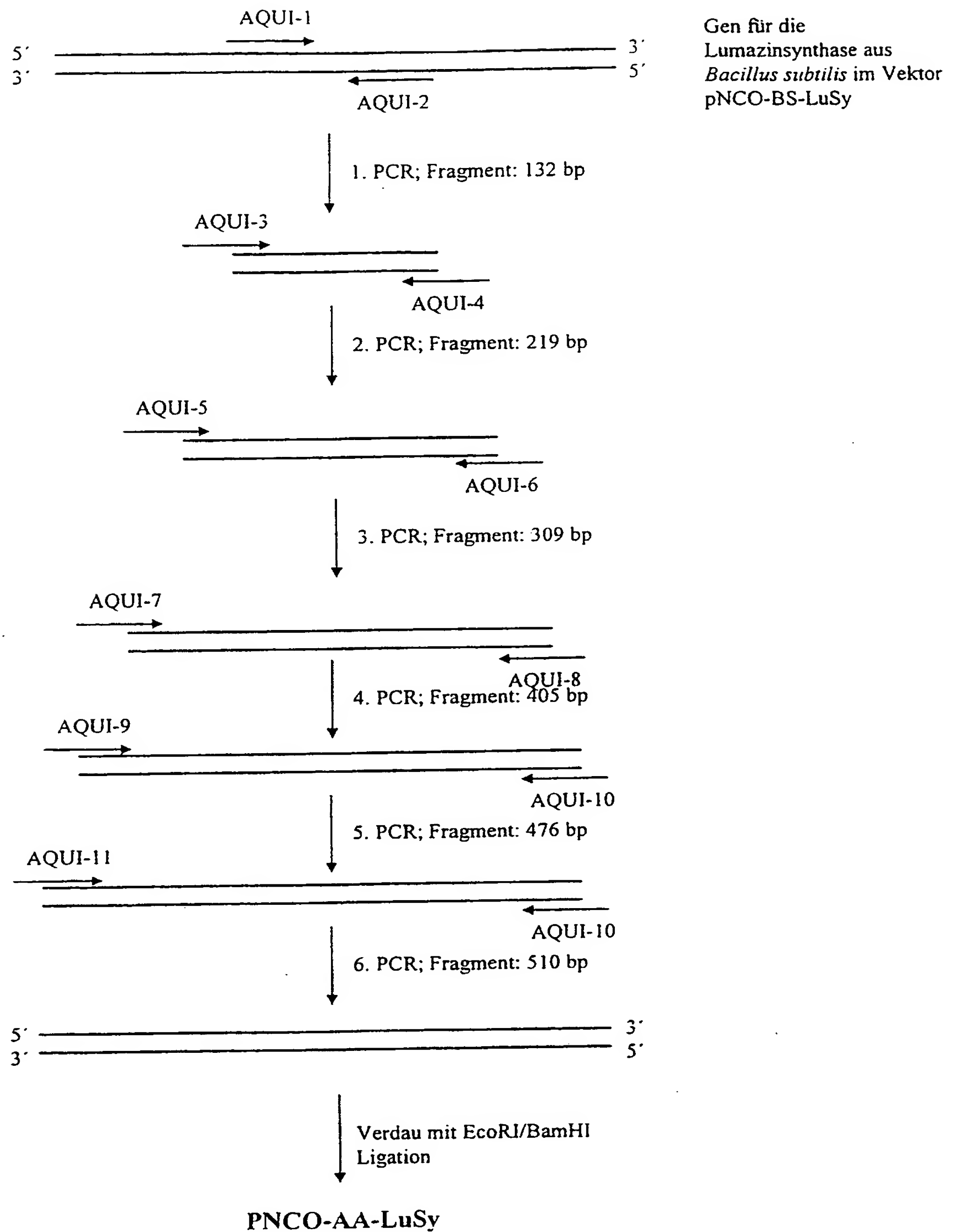




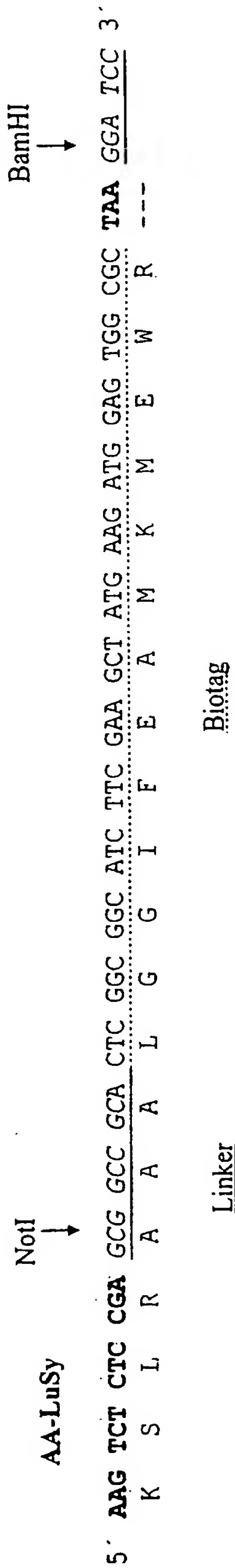
Figur 23



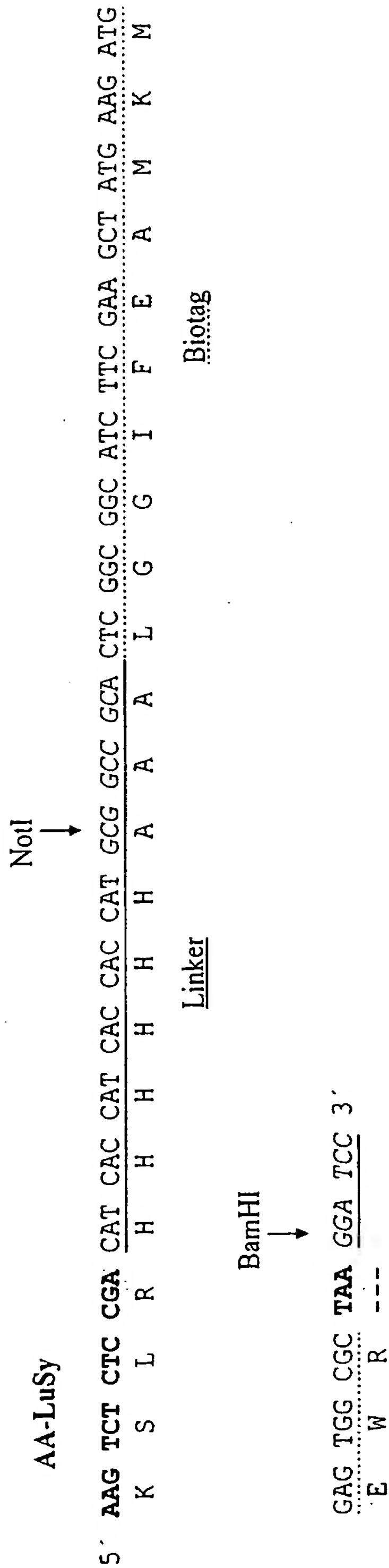
Figur 24



Figur 25

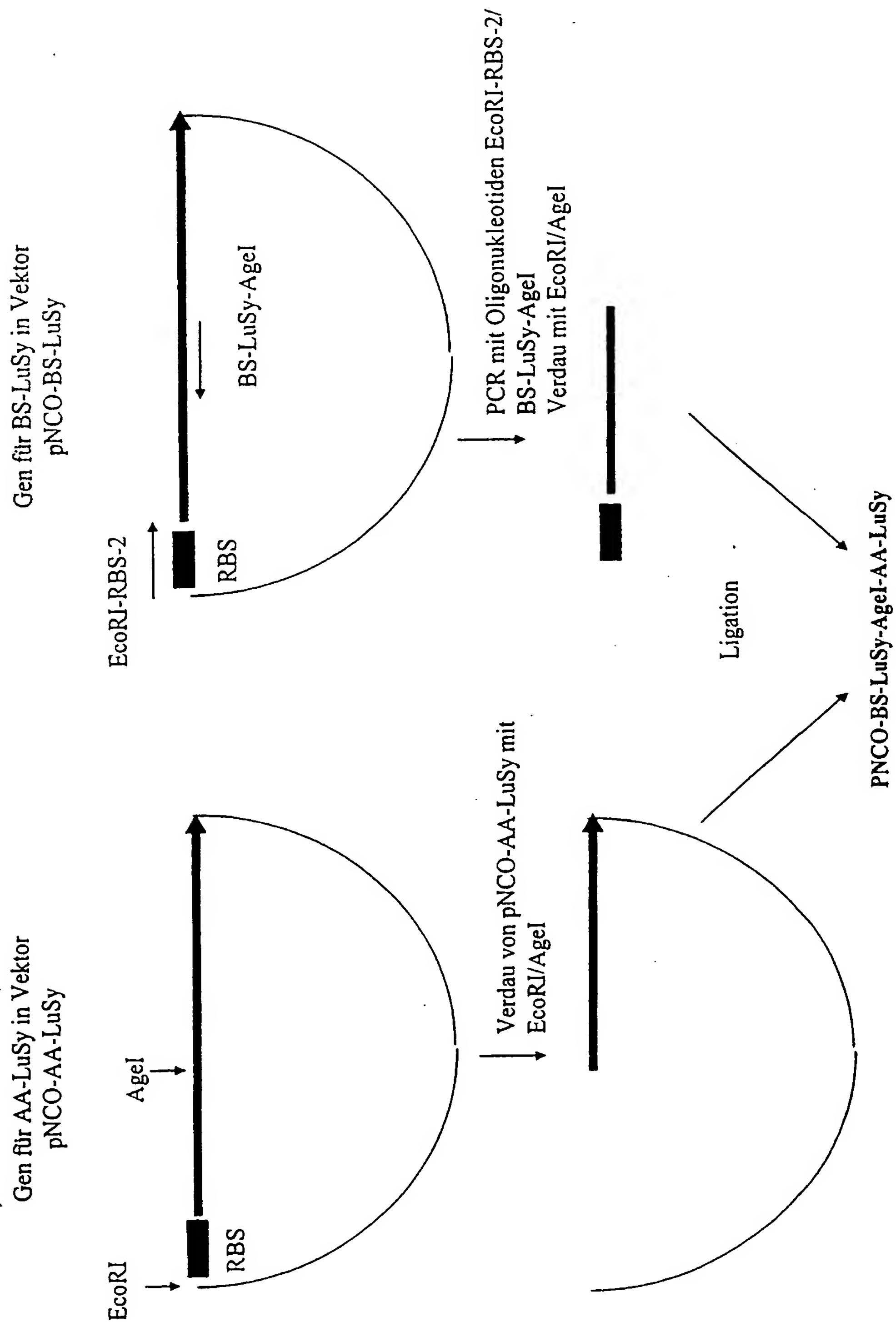


Figur 26

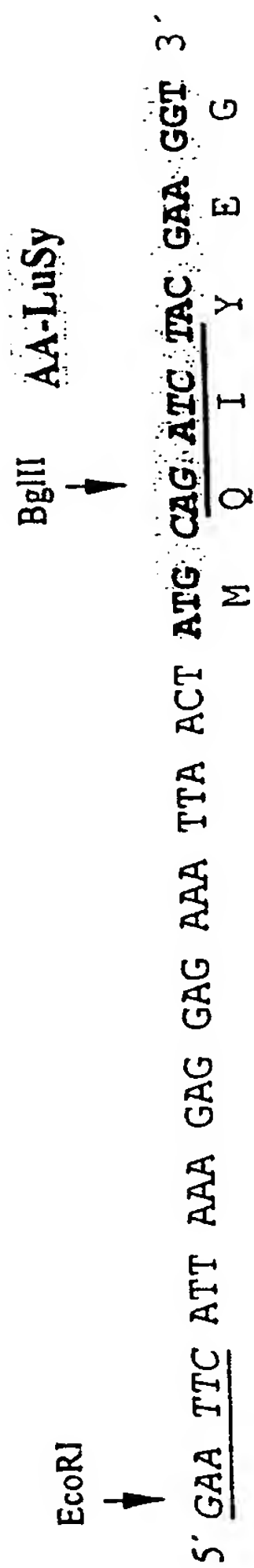


Figur 27

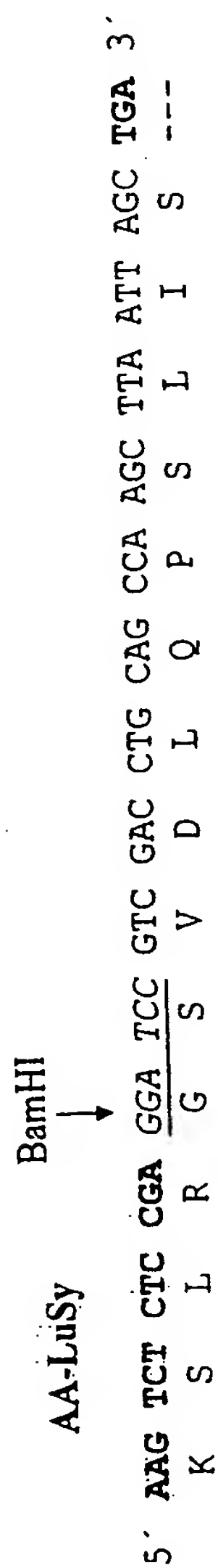




Figur 29



Figur 30



Figur 31

Sequenzprotokolle

SEQ ID No.1: pNC0113

Expressionsvektor zur Überexpression von Genen in E. coli

SEQUENCE 3420 BP; 388 A; 316 C; 828 G; 888 T; 0 OTHER..

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGGGA
GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTTAATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT
TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
ATTTTGAGGC ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
TTACGGCCTT TTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC
ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTTTC TATGGCAATG AAAGACGGTG
AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTACCCCTT GTTACACCGT TTCCATGAG CAAACTGAAA
CGTTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT
CGCAAGATGT GGCGTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA
ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTTGAT TTAAACGTGG
CCAATATGGA CAACTTCTTC GCCCCCGTTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGCAA
GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGGCG
TAATTTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCCT TAAACGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT
GAGGCATCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG GCCTTTCGTT TTATCTGTTG
TTTGTCGGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCCTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC
TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCCCTCGCT CACTGACTCG
CTGCGCTCGG TCTGTGGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
GCCAGGAACC GTAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCACGC
TGTAGGTATC TCAGTTGGGT GTAGGTGCTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT

ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAGAGT CCTTGGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
 CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
 ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
 ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
 TTTCGTTTCAT CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
 TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAGG GCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
 AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACG CTCGTCTGTTT
 GGTATGGCTT CATTGAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
 GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
 CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
 ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAACGCT TCTTCGGGGC GAAAACCTCTC AAGGATCTTA
 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
 TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG
 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA
 AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
 AAACAAATAG GGGTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC

//

SEQ ID No.2: p602/-CAT

Expressionsvektor zur Überexpression von Genen in E. coli und B. subtilis

SEQUENCE: 5302 BP; 1502 A; 1208 C; 962 G; 1630 T; 0 OTHER..

GAATTAATTC CTCGAGGCTG GCATCCCTAA CATATCCGAA TGGTTACTTA AACAACGGAG
 GACTAGCGTA TCCCTTCGCA TAGGGTTTGA GTTAGATAAA GTATATGCTG AACTTTCTTC
 TTTGCTCAAA GAATCATAAA AAATTTATTT GCTTTCAGGA AAATTTTCT GTATAATAGA
 TTCAAATTGT GAGCGGATAA CAATTTGAAT TCATTAAAGA GGAGAAATTA ACTATGAGGG
 GATCCGTCGA CCTGCAGCCA AGCTTAGCTA GCTAGAGCTT GGCGAGATTT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC CGTTGATATA TCCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTTGAG GCATTTTCACT CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAGACCG
 TTCAGACTGC GATGAGTGGC AGGGCGGGGC GTAAATTTTT TAAGGCAGTT ATTGGTGCCC
 TTAAACGCCT GGGGTAATGA CTCTCTAGCT TGAGGCATCA AATAAAACGA AAGGCTCAGT
 CGAAAGACTG GGCTTTTCGT TTTATCTGTT GTTTGTCGGT GAACGCTCTC CTGAGTAGGA
 CAAATCCGCC GCTCTAGAGC TGCCTGCCGC GTTTCGGTGA TGACGGTGAA AACCTCTGAC
 ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG

CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG GGTGTTGSCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC
GTAGCGATAG CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT ACCGCATCAG
GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTGGGC TCGGGCGAGC
GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG
AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAGG CCGCGTTGCT
GGCGTTTTTC CATAGGCTCC GCGCGCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATPAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT
CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC
GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC AATGCTCAGC CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT
TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCGCGTTCAG CCGACCGCT GCGCCTTATC
CGGTAACATAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG
GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC
AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG
CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAATAAGGAT CTCAAGAAGA
TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTCGGTA CCGCTGATTT
CACTTTTTGC ATTCTACAAA CTGCATAACT CATATGTAAA TCGCTCCTTT TTAGGTGGCA
CAAATGTGAG GCATTTTCGC TCTTTCCGGC AACCCTTCC AAGTAAAGTA TAACACACTA
TACTTTATAT TCATAAAGTG TGTGTCCTGC GAGGCGTCCA GTGCCGACCA AAACCATAAA
ACCTTTAAGA CCTTTCTTTT TTTTACGAGA AAAAAGAAAC AAAAAACCT GCCCTCTGCC
ACCTCAGCAA AGGGGGGTTT TGCTCTCGTG CTCGTTTAAA AATCAGCAAG GGACAGGTAG
TATTTTTTGA GAAGATCACT CAAAAAATCT CCACCTTTAA ACCCTTGCCA ATTTTTATTT
TGTCGGTTTT GTCTAGCTTA CCGAAAGCCA GACTCAGCAA GAATAAAATT TTTATTGTCT
TTCGGTTTTT TAGTGTAACG GACAAACCA CTCAAAATAA AAAAGATACA AGAGAGGTCT
CTCGTATCTT TTATTCAGCA ATCGCGCCCG ATTGCTGAAC AGATTAATAA TAGATTTTAG
CTTTTTATTT GTTGAAAAAA GCTAATCAAA TTGTGTGCGG GATCAATTAC TGCAAAGTCT
CGTTCATCCC ACCACTGATC TTTTAATGAT GTATTGGGGT GCAAAATGCC CAAAGGCTTA
ATATGTTGAT ATAATTCATC AATTCCTCT ACTTCAATGC GGCAACTAGC AGTACCAGCA
ATAAACGACT CCGCACCTGT ACAAACCGGT GAATCATTAC TACGAGAGCG CCAGCTTCAT
CACTTGCCTC CCATAGATGA ATCCGAACCT CATTACACAT TAGAACTGCG AATCCATCTT
CATGGTGAAC CAAAGTGAAA CCTAGTTTAT CGCAATAAAA ACCTATACTC TTTTAAATAT
CCCCGACTGG CAATGCGGGA TAGACTGTAA CATTCTCACG CATAAAATCC CCTTTCATTT
TCTAATGTAA ATCTATTACC TTATTATTAA TTCAATTGCG TCATAATTAA TCCTTTTTCT
TATTACGCAA AATGGCCCGA TTTAAGCACA CCCTTTATTC CGTTAATGCG CCATGACAGC
CATGATAATT ACTAATACTA GGAGAAGTTA ATAAATACGT AACCAACATG ATTAACAATT
ATTAGAGGTC ATCGTTCAAA ATGGTATGCG TTTTGACACA TCCACTATAT ATCCGTGTGCG
TTCTGTCCAC TCCTGAATCC CATTCCAGAA ATTCTCTAGC GATTCCAGAA GTTTCTCAGA
GTCGGAAAGT TGACCAGACA TTACGAACGT GCACAGATGG TCATAACCTG AAGGAAGATC
TGATTGCTTA ACTGCTTCAG TTAAGACCGA AGCGCTCGTC GTATAACAGA TGCGATGATG
CAGACCAATC AACATGGCAC CTGCCATTGC TACCTGTACA GTCAAGGATG GTAGAAATGT

TGTCCGGTCCT TGCACACGAA TATTACGCCA TTTGCCTGCA TATTCAPACA GCTCTTCTAC
 GATAAGGGCA CAAATCGCAT CGTGGPACGT TTGGGCTTCT ACCGATTTAG CAGTTGGATA
 CACTTTCTCT AAGTATCCAC CTGAATCATA AATCGGCAAA ATAGAGAAAA ATTGACCATG
 TGTAAGCGGC CAATCTGATT CCACCTGAGA TGCATPATCT AGTAGAATCT CTTCGCTATC
 AAAATTCACT TCCACCTTCC ACTCACCGGT TGTCCATTCA TGGCTGAACT CTGCTTCCTC
 TGTTGACATG ACACACATCA TCTCAATATC CGAATAGGGC CCATCAGTCT GACGACCAAG
 AGAGCCATAA ACACCAATAG CCTTAACATC ATCCCCATAT TTATCCAATA TTCGTTCCCTT
 AATTTTCATGA ACAATCTTCA TTCTTTCTTC TCTAGTCATT ATTATTGGTC CATTCACTAT
 TCTCATTCCC TTTTCAGATA ATTTTAGATT TGCTTTTCTA AATAAGAATA TTTGGAGAGC
 ACCGTTCTTA TTCAGCTATT AATAACTCGT CTTCTTAAGC ATCCTTCAAT CCTTTTAATA
 ACAATTATAG CATCTAATCT TCAACAACT GGCCCGTTTG TTGAACTACT CTTTAATAAA
 ATAATTTTTC CGTTCCCAAT TCCACATTGC AATAATAGAA AATCCATCTT CATCGGCTTT
 TTCGTCATCA TCTGTATGAA TCAAATCGCC TTCTTCTGTG TCATCAAGGT TTAATTTTTT
 ATGTATTTCT TTTAACAAAC CACCATAGGA GATTAACTT TTACGGTGTA AACCTTCCTC
 CAAATCAGAC AAACGTTTCA AATTCTTTTC TTCATCATCG GTCATAAAAT CCGTATCCTT
 TACAGGATAT TTTGCAGTTT CGTCAATTGC CGATTGTATA TCCGATTTAT ATTTATTTTT
 CGGTGCAATC ATTTGAACTT TTACATTTGG ATCATAGTCT AATTTTCATTG CCTTTTTCCA
 AAATTGAATC CATTGTTTTT GATTCAAGTA GTTTTCTGTA TTCTTAAAT AAGTTGGTTC
 CACACATACC AATACATGCA TGTGCTGATT ATAAGAATTA TCTTTATTAT TTATTGTCAC
 TTCCGTTGCA CGCATAAAAC CAACAAGATT TTTATTAATT TTTTATATAT GCATCATTCG
 GCGAAATCCT TGAGCCATAT CTGACAACT CTTATTTAAT TCTTCGCCAT CATAAACATT
 TTTAACTGTT AATGTGAGAA ACAACCAACG AACTGTTGGC TTTTGTTTAA TAACTTCAGC
 AACAACTTT TGTGACTGAA TGCCATGTTT CATTGCTCTC CTCCAGTTGC ACATTGGACA
 AAGCCTGGAT TTACAAAACC AACTCGATA CAACTTTCTT TCGCCTGTTT CACGATTTTG
 TTTATACTCT AATATTTTCA CACAATCTTT TACTCTTCA GCCTTTTTTAA ATTCAAGAAT
 ATGCAGAAGT TCAAAGTAAT CAACATTAGC GATTTTCTTT TCTCTCCATG GTCTCACTTT
 TCCACTTTTT GTCTTGTTCA CTAAACCCCT TGATTTTCA TCTGAATAAA TGCTACTATT
 AGGACACATA ATATTAAAAG AAACCCCAT CTATTTAGTT ATTTGTTTAG TCACTTATAA
 CTTTAACAGA TGGGGTTTTT CTGTGCAACC AATTTTAAGG GTTTTCAATA CTTTAAACA
 CATAATACC AACACTTCAA CGCACCTTTC AGCAACTAAA ATAAAAATGA CGTTATTTCT
 ATATGTATCA AGATAAGAAA GAACAAGTTC AAAACCATCA AAAAAAGACA CCTTTTCAGG
 TGCTTTTTTT ATTTTATAAA CTCATTCCCT GATCTCGACT TCGTTCTTTT TTTACCTCTC
 GGTTATGAGT TAGTTCAAAT TCGTTCTTTT TAGGTTCTAA ATCGTGTTTT TCTTGGAATT
 GTGCTGTTTT ATCCTTTACC TTGTCTACAA ACCCCTTAAA AACGTTTTTA AAGGCTTTTA
 AGCCGTCTGT ACGTTCCTTA AG//

SEQ ID No.3: pNCO-BS-Lusy

Lumazinsynthase-Gen aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* exprimiert

SEQUENCE 3885 BP; 1040 A; 505 C; 939 G; 1001 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
ATCATAAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTGGAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACTT AAACCGTTCT TTCGAATAAC CATGGGGATC CGTCGACCTG
CAGCCAAGCT TAATTAGCTG AGCTTGGACT CCTGTTGATA GATCCAGTAA TGACCTCAGA
ACTCCATCTG GATTTGTTCA GAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTTA TTGGTGAGAA
TCCAAGCTAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA
CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCAAT GGCATCGTAA AGAACATTTT GAGGCATTTC
AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTTTAA
AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTTT ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCCCGC
TGATGAATGC TCATCCGGAA TTTCGTATGG CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG
ATAGTGTTCA CCCTTGTTAC ACCGTTTTTC ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCATCGCTCT
GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT TTCTACACAT ATATTCGCAA GATGTGGCGT
GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA AAGGGTTTAT TGAGAATATG TTTTTCGTCT
CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT TTGATTTAAA CGTGGCCAAT ATGGACAAC
TCTTCGCCCC CGTTTTACAC ATGCATGGGC AAATATTATA CGCAAGGCGA CAAGGTGCTG
ATGCCGCTGG CGATTCAGGT TCATCATGCC GTCTGTGATG CTTCCATGT CGGCAGAATG
CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG GGGCGTAATT TTTTAAAGGC
AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGGTA ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAATAAA
ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTTATC TGTTGTTTGT CGGTGAACGC
TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGCTCTA GAGCTGCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG
TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC
CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT GGGGGGTGTC GGGGCGCAGC
CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTATACTGGC TTAACATATG GGCATCAGAG
CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGCGG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA
AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT
CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA
GGGGATAACG CAGGAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTCCATAGG CTCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAT
CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAACCAG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC
CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCCTG CGCTTACCGG ATACCTGTCC
GCCTTTCTCC CTTGGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC

CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG
 CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACTACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA
 ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA
 GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC
 TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA
 AATTAAAAAT GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT
 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCTG TTCATCCATA
 GCTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC
 CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
 TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC
 GTTGTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC
 AGCTCCGGTT CCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC
 ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT
 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC
 TCTTGCCCCG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC
 ATCATTTGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC
 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC
 GTTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA
 CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
 TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT
 CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA
 TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCAGGAGG CCCTTTCGTC TTCAC//

SEQ ID No. 4: p602-BS-Lusy

Expressionsvektor p602/-CAT mit Lumazinsynthase-Gen aus *Bacillus subtilis*

SEQUENCE 5767 BP; 1654 A; 1297 C; 1073 G; 1743 T; 0 OTHER;

GAATTAATTC CTCGAGGCTG GCATCCCTAA CATATCCGAA TGGTTACTTA PACAACGGAG
 GACTAGCGTA TCCCTTCGCA TAGGGTTTGA GTTAGATAAA GTATATGCTG AACTTTCTTC
 TTTGCTCAAA GAATCATAAA AAATTTATTT GCTTTCAGGA AAATTTTTCT GTATAATAGA
 TTCAAATTGT GAGCGGATAA CAATTTGAAT TCATTAAAGA GGAGAAATTA ACTATGAATA
 TCATACAAGG AAATTTAGTT GGTACAGGTC TTAATATCGG AATCGTAGTA GGAAGATTTA
 ATGATTTTAT TACGAGCAAG CTGCTGAGCG GAGCAGAAGA TSCGCTGCTC AGACATGGCG
 TAGACACAAA TGACATTGAT GTGGCTTGGG TTCCAGGCGC ATTTGAAATA CCGTTTGCTG
 CGAAAAAAT GCGGGAACA AAAAAATATG ATGCTATTAT CACATTGGGC ACTGTCATCA

GAGGCGCAAC GACACATTAC GATTATGTCT GCATGAGGC TGCAAAAGGC ATCGCGCAAG
CAGCAAACAC TACTGGTGTA CCTGTCTCTT TTGGAATTGT AACAACTGAA AACATCGAAC
AGGCTATCGA GCGTGCCGGC ACAAAGCGG GCAACAAAGG TGTAGATTGT GCTGTTTCTG
CCATTGAAAT GGCAAACTTA AACCGTTCTT TCGAATAACC ATGGGGATCC STCGACCTGC
AGCCAAGCTT AGCTAGCTAG AGCTTGGCGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG
AGAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG ACTGCGATGA
GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTTAAGG CAGTTATTGG TGCCCTTAAA CGCCTGGGGT
AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAATATA AACGAAGGC TCAGTCGAAA GACTGGGCCT
TTCGTTTTAT CTGTTGTTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG TAGGACAAAT CCGCCGCTCT
AGAGCTGCCT GCCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG
AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT
CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG
TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG
GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCT CTTCGCTTC
CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC
AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC
AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG
GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC
GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT
TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT
TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG
CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT
TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT
TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGG
CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA
AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT
TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC
TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT
ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT CGGTACCGCT GATTTCACTT TTTGCATTCT
ACAAACTGCA TAACTCATAT GTAAATCGCT CCTTTTTAGG TGGCACAAAT GTGAGGCATT
TTCGCTCTTT CCGGCAACCA CTTCCAAGTA AAGTATAACA CACTATACTT TATATTCATA
AAGTGTGTGT CCTGCGAGGC GTCCAGTGCC GACCAAAACC ATAAAACCTT TAAGACCTTT
CTTTTTTTTA CGAGAAAAAA GAAACAAAAA AACCTGCCCT CTGCCACCTC AGCAAAGGGG
GGTTTTGCTC TCGTGCTCGT TTAAATATCA GCAAGGGACA GGTAGTATTT TTTGAGAAGA
TCACTCAAAA AATCTCCACC TTAAACCCT TGCCATTTT TATTTTGTCC GTTTTGTCTA
GCTTACCGAA AGCCAGACTC AGCAAGAATA AAATTTTTAT TGTCTTTCCG TTTTCTAGTG
TAACGGACAA AACCACCTCA AATAAAAAAG ATACAGAGA GGTCTCTCGT ATCTTTTATT
CAGCAATCGC GCCCGATTGC TGAACAGATT AATAATAGAT TTTAGCTTTT TATTTGTTGA
AAAAAGCTAA TCAAATTGTT GTCGGGATCA ATTACTGCAA AGTCTCGTTC ATCCCACCAC
TGATCTTTTA ATGATGTATT GGGGTGCAAA ATGCCCAAG GCTTAATATG TTGATATAAT
TCATCAATTC CCTCTACTTC AATGCGGCAA CTAGCAGTAC CAGCAATAAA CGACTCCGCA

CCTGTACAAA CCGGTGAATC ATTACTACGA GAGCGCCAGC TTCATCACTT GCCTCCCATA
GATGAATCCG AACCTCATTA CACATTAGAA CTGCGAATCC ATCTTCATGG TGAACCAAAG
TGAAACCTAG TTTATCGCAA TAAAAACCTA TACTCTTTTT AATATCCCCG ACTGGCAATG
CGGGATAGAC TGTAACATTC TCACGCATAA AATCCCCCTT CATTTTCTAA TGTAAATCTA
TTACCTTATT ATTAATTCAA TTCGCTCATA ATTAATCCTT TTTCTTATTA CGCAAAATGG
CCCGATTTAA GCACACCCTT TATTCCCTTA ATGCGCCATG ACAGCCATGA TAATTACTAA
TACTAGGAGA AGTTAATAAA TACGTAAACCA ACATGATTAA CAATTATTAG AGGTCATCGT
TCAAAATGGT ATGCGTTTTG ACACATCCAC TATATATCCG TGTCGTTCTG TCCACTCCTG
AATCCCATTG CAGAAATTCT CTAGCGATTG CAGAAGTTTC TCAGAGTCGG AAAGTTGACC
AGACATTACG AACTGGCACA GATGGTCATA ACCTGAAGGA AGATCTGATT GCTTAACTGC
TTCAGTTAAG ACCGAAGCGC TCGTCGTATA ACAGATGCGA TGATGCAGAC CAATCAACAT
GGCACCTGCC ATTGCTACCT GTACAGTCAA GGATGGTAGA AATGTTGTGG GTCCTTGCAC
ACGAATATTA CGCCATTTGC CTGCATATTC AACAGCTCT TCTACGATAA GGGCACAAAT
CGCATCGTGG AACGTTTGGG CTTCTACCGA TTTAGCAGTT GGATACACTT TCTCTAAGTA
TCCACCTGAA TCATAAATCG GCAAAATAGA GAAAAATTGA CCATGTGTAA GCGGCCAATC
TGATTCCACC TGAGATGCAT AATCTAGTAG AATCTCTTCG CTATCAAAAT TCACTTCCAC
CTTCCACTCA CCGGTTGTCC ATTCATGGCT GAACTCTGCT TCCTCTGTTG ACATGACACA
CATCATCTCA ATATCCGAAT AGGGCCCATC AGTCTGACGA CCAAGAGAGC CATAAACACC
AATAGCCTTA ACATCATCCC CATATTTATC CAATATTCGT TCCTTAATTT CATGAACAAT
CTTCATTCTT TCTTCTCTAG TCATTATTAT TGGTCCATTG ACTATTCTCA TTCCCTTTTC
AGATAATTTT AGATTTGCTT TTCTAAATAA GAATATTTGG AGAGCACCGT TCTTATTCAG
CTATTAATAA CTCGTCTTCC TAAGCATCCT TCAATCCTTT TAATAACAAT TATAGCATCT
AATCTTCAAC AACTGGCCC GTTTGTTGAA CTACTCTTTA ATAAAATAAT TTTTCCGTTT
CCAATTCCAC ATTGCAATAA TAGAAAATCC ATCTTCATCG GCTTTTTTCGT CATCATCTGT
ATGAATCAAA TCGCCTTCTT CTGTGTCATC AAGGTTTAAT TTTTATGTA TTTCTTTTAA
CAAACCACCA TAGGAGATTA ACCTTTTACG GTGTAAACCT TCCTCCAAAT CAGACAAACG
TTTCAAATTC TTTTCTTCAT CATCGGTCAT AAAATCCGTA TCCTTTACAG GATATTTTGC
AGTTTCGTCA ATTGCCGATT GTATATCCGA TTTATATTTA TTTTTCGGTC GAATCATTTG
AACTTTTACA TTTGGATCAT AGTCTAATTT CATTGCCTTT TTCCAAAATT GAATCCATTG
TTTTTGATTC ACGTAGTTTT CTGTATTCTT AAAATAAGTT GGTTCCACAC ATACCAATAC
ATGCATGTGC TGATTATAAG AATTATCTTT ATTATTTATT GTCACTTCCG TTGCACGCAT
AAAACCAACA AGATTTTTAT TAATTTTTTT ATATTGCATC ATTCGGCGAA ATCCTTGAGC
CATATCTGAC AACTCTTAT TTAATTCTTC GCCATCATAA ACATTTTTTAA CTGTTAATGT
GAGAAACAAC CAACGAACCT TTGGCTTTTG TTTAATAACT TCAGCAACAA CCTTTTGTGA
CTGAATGCCA TGTTTCATTG CTCTCCTCCA GTTGACACATT GGACAAAGCC TGGATTTACA
AAACCACACT CGATACAACT TTCTTTCCGC TGTTCACGA TTTTGTTTAT ACTCTAATAT
TTCAGCACAA TCTTTTACTC TTTCAGCCTT TTTAAATTCA AGAATATGCA GAAGTTCAAA
GTAATCAACA TTAGCGATTT TCTTTTCTCT CCATGGTCTC ACTTTTCCAC TTTTGTCTT
GTCCACTAAA ACCCTTGATT TTTATCTGTA ATAAATGCTA CTATTAGGAC ACATAATATT
AAAAGAAACC CCCATCTATT TAGTTATTTG TTTAGTCACT TATAACTTTA ACAGATGGGG
TTTTTCTGTG CAACCAATTT TAAGGGTTTT CAATACTTTA AAACACATAC ATACCAACAC
TTCAACGCAC CTTTCAGCAA CTAAAATAAA AATGACGTTA TTTCTATATG TATCAAGATA

AGAAAGAACA AGTTCAAAAC CATCAAAAA AGACACCTTT TCAGGTGCTT TTTTATTTT
 ATAAACTCAT TCCCTGATCT CGACTTCGTT CTTTTTTTAC CTCTCGGTTA TGAGTTAGTT
 CAAATTCGTT CTTTTTAGGT TCTAAATCGT GTTTTTCTTG GAATTGTGCT GTTTTATCCT
 TTACCTTGTC TACAAACCCC TTAATAACGT TTTTAAAGGC TTTTAAGCCG TCTGTACGTT
 CCTTAAG//

SEQ ID No.5: pNCO-BS-Lusy-C93S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 93 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 902 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTT TCGAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTT AAACCGCTCA TTTGAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTGCCC CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT GGAGAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTTCTG ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCCTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AACTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTC GCGTGTTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTC AGGTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCC AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTGGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCCG ATGCCGGGAG

CAGACAAGCC CCTCAGGGCG CGTCAGGGG TGTGGGCGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAAC ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTA CTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTGGGCTG
CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAPAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAPAGGCG CAGCAAPAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCGGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGGACGCGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCGGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
GCCTTATCCG GTA ACTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC
GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCACGT
TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTATC CATAGCTGCC
TGA CTCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT
GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT
GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTACGCG TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
TCCTTCGGTC CTCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT
ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC
ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTA CTTTAC CAGCGTTTCT
GGGTGAGCAA AACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
TATAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.6: pNCO-BS-Lusy-C139S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 139 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 902 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;

```

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACCATGAAT
ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTAAATATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATCCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTC AGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAATTT AAACCGCTCA TTTGAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
ATGCTCATCC GGAATTTCTG ATGGCAATGA AAGACSGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACCTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG
GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTGTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
CTGGCGATTC AGGTTTATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
GGCTCAGTCC AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGSGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACCT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTGCGCTG
CGCGGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCAGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG

```

```

TAGGTCGTTT  GCTCCAAGCT  GGGCTGTGTG  CACGAACCCC  CCGTTCAGCC  CGACCGCTGC
GCCTTATCCG  GTAACATATCG  TCTTGAGTCC  AACCCGGTAA  GACACGACTT  ATCGCCACTG
GCAGCAGCCA  CTGGTAACAG  GATTAGCAGA  GCGAGGTATG  TAGGCGGTGC  TACAGAGTTC
TTGAAGTGGT  GGCCTAATA  CGGCTACACT  AGAAGGACAG  TATTTGGTAT  CTGCGCTCTG
CTGAAGCCAG  TTACCTTCGG  AAAAAGAGTT  GGTAGCTCTT  GATCCGGCAA  ACAAACCACC
GCTGGTAGCG  GTGGTTTTTT  TGTGTCGAG  CAGCAGATTA  CGCGCAGAAA  AAAAGGATCT
CAAGAAGATC  CTTTGATCTT  TTCTACGGGG  TCTGACGCTC  AGTGGAACGA  AAATCAGCT
TAAGGGATTT  TGGTCATGAG  ATTATCAAAA  AGGATCTTCA  CCTAGATCCT  TTTAAATTAA
AAATGAAGTT  TTAAATCAAT  CTAAAGTATA  TATGAGTAAA  CTTGGTCTGA  CAGTTACCAA
TGCTTAATCA  GTGAGGCACC  TATCTCAGCG  ATCTGTCTAT  TTCGTTTCATC  CATAGCTGCC
TGACTCCCCG  TCGTGTAGAT  AACTACGATA  CGGGAGGGCT  TACCATCTGG  CCCCAGTGCT
GCAATGATAC  CGCGAGACCC  ACGCTCACC  GCTCCAGATT  TATCAGCAAT  AAACCAGCCA
GCCGGAAGGG  CCGAGCGCAG  AAGTGGTCCT  GCAACTTTAT  CCGCCTCCAT  CCAGTCTATT
AATTGTTGCC  GGAAGCTAG  AGTAAGTAGT  TCGCCAGTTA  ATAGTTTGCG  CAACGTTGTT
GCCATTGCTA  CAGGCATCGT  GGTGTCACGC  TCGTCGTTTG  GTATGGCTTC  ATTCAGCTCC
GGTTCCCAAC  GATCAAGGCG  AGTTACATGA  TCCCCCATGT  TGTGCAAAA  AGCGGTTAGC
TCCTTCGGTC  CTCCGATCGT  TGTCAGAAGT  AAGTTGGCCG  CAGTGTTATC  ACTCATGGTT
ATGGCAGCAC  TGCATAATTC  TCTTACTGTC  ATGCCATCCG  TAAGATGCTT  TTCTGTGACT
GGTGAGTACT  CAACCAAGTC  ATTCTGAGAA  TAGTGTATGC  GGCGACCGAG  TTGCTCTTGC
CCGGCGTCAA  TACGGGATAA  TACCGCGCCA  CATAGCAGAA  CTTTAAAAGT  GCTCATCATT
GGAAAACGTT  CTTCCGGGGCG  AAAACTCTCA  AGGATCTTAC  CGCTGTTGAG  ATCCAGTTTCG
ATGTAACCCA  CTCGTGCACC  CAACTGATCT  TCAGCATCTT  TTACTTTCAC  CAGCGTTTCT
GGGTGAGCAA  AAACAGGAAG  GCAAAATGCC  GCAAAAAGG  GAATAAGGGC  GACACGGAAA
TGTTGAATAC  TCATACTCTT  CCTTTTTCAA  TATTATTGAA  GCATTTATCA  GGGTTATTGT
CTCATGAGCG  GATACATATT  TGAATGTATT  TAGAAAAATA  AACAAATAGG  GGTTCCGCGC
ACATTTCCCC  GAAAAGTGCC  ACCTGACGTC  TAGAAACCA  TTATTATCAT  GACATTAACC
TATAAAAATA  GCGGTATCAC  GAGGCCCTTT  CGTCTTCAC//

```

SEQ ID No.7: pNCO-BS-Lusy-C93/139S

Lumazinsynthase-Gen aus *B. subtilis* in *E. coli* exprimiert. Cystein an Position 93 und 139 gegen Serin ersetzt.

SEQUENCE 3879 BP; 1039 A; 902 C; 937 G; 1001 T; 0 OTHER;

```

CTCGAGAAAT  CATAAAAAAT  TTATTTGCTT  TGTGAGCGGA  TAACAATTAT  AATAGATTCA
ATTGTGAGCG  GATAACAATT  TCACACAGAA  TTCATTAAAG  AGGAGAAATT  AACCATGAAT
ATCATAACAAG  GAAATTTAGT  TGGTACAGGT  CTTAAAATCG  GAATCGTAGT  AGGAAGATTT
AATGATTTTA  TTACGAGCAA  GCTGCTGAGC  GGAGCAGAA  ATGCGCTGCT  CAGACATGGC
GTAGACACAA  ATGACATTGA  TGTGGCTTGG  GTCCAGGCG  CATTTGAAAT  ACCGTTTGCT
GCGAAAAAA  TGGCGGAAAC  AAAAAAATAT  GATGCTATTA  TCACATTGGG  CACTGTCATC

```


AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTT TCGAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG AGCTGTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTT AAACCGCTCA TTTGAATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCCTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAAGTGAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTC AGGTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCTCGCT ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCTCA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
 TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACATATG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTFGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAGTCACGT
 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTCACT CATAGCTGCC

TGA CTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGSTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
 GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAAGAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTA CTTCAC CAGCGTTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTGTAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.8: pNCO-N-BS-Lusy

Expressionsvektor zur N-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die
 Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis*

SQ SEQUENCE 3912 BP; 1042 A; 911 C; 951 G; 1008 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGGCG
 GCGGCGCGTA GCTGCGCGGC CGCTATGAAT ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT
 CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC
 GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG
 GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT GCGAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT
 GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC AGAGCGCGCA CGACACATTA CGATTATGTC
 TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC
 TTTGGAATTC TAACAACCTGA AAACATCGAA CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG
 GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT GCCATTGAAA TGGCAAATTT AAACCGCTCA
 TTTGAATAAT TTGGATCCGT CGACCTGCAG CCAGCTTAA TTAGCTGAGC TTGGACTCCT
 GTTGATAGAT CCAGTAATGA CCTCAGAACT CCATCTGGAT TTGTTCAAGAA CGCTCGGTTG
 CCGCCGGGCG TTTTATTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGCGAGATTT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC CGTTGATATA TCCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTTGAG GCATTTCACT CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAGACCG
 TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA AAATAAGCAC AAGTTTATC

CGGCCTTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA TCCGGAAATTT CGTATGGCAA
TGAAAGACGG TSAGCTGGTG ATATGGGATA GTGTTCACCC TTGTTACACC GTTTTCCATG
AGCAAACTGA AACGTTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTC CGGCAGTTTC
TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG
GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG GGTGAGTTTC ACCAGTTTTG
ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACTTCT TCGCCCCCGT TTTCACCATG CATGGGCAAA
TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG CCGCTGGCGA TTCAGGTTCA TCATGCCGTC
TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG
CAGGGCGGGG CGTAATTTTT TTAAGGCAGT TATTGGTGCC CTTAAACGCC TGGGGTAATG
ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTCTG
TTTTATCTGT TGTGTGTCGG TGAACGCTCT CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CGCTCTAGAG
CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC
GGTCACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC
GGGTGTTGGC GGGTGTCGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA GCGGAGTGTA
TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT
GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG
CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTGCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA
GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG
ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGGCTTTCT
CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT
GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACCTA TCGTCTTGAG
TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC
ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTGTTGC
AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG
GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT
ATATATGAGT AACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
GCGATCTGTC TATTTGTTTC ATCCATAGCT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG
ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA
CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT
AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTGAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA
TGATCCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA
AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA
GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG

```

CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCCTC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC
TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA
TCTTCAGCAT CTTTACTTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAACAGG AAGGCAAAAT
GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT
CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC
GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC
TTTCGTCTTC AC//

```

SEQ ID No.9: pNCO-C-BS-Lusy

Expressionsvektor zur C-terminalen Fusion von Fremdproteinen an die
Lumazinsynthese aus *B. subtilis*

SEQUENCE 3900 BP; 1046 A; 906 C; 942 G; 1006 T; 0 OTHER;

```

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAATTAT AAACCGCTCA TTTGAATTAG CGGCCGCAA CAGTTTAAAA
GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTTAATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT
TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
ATTTTGAGGC ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
TTACGGCCTT TTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC
ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTTTC TATGGCAATG AAAGACGGTG
AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTCAACCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
CGTTTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT
CGCAAGATGT GCGGTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA
ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTTGAT TTAAACGTGG
CCAATATGGA CAACTTCTTC GCGCCCGTTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGCAA
GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGGCG
TAATTTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCCT TAAACGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT

```

CAGGCATCAA ATAAACCGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG GCCTTTCGTT TTATCTGTTG
TTTGTCGGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGRGTGTATA CTGGCTTAAC
TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCTCTCGCT CACTGACTCG
CTGCGCTCGG TCTGTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCACGC
TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTEGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT
ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC
ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
TTTCGTTTCA CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CCGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACAG CTCGTCGTTT
GGTATGGCTT CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA
CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA
AGCATTTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC //

SEQ ID No.10: pNCO-EC-DHFR-BS-Lusy

pNCO-N-BS-Lusy mit DHFR-Gen aus Escherichia coli

SEQUENCE 4368 BP; 1158 A; 1020 C; 1078 G; 1112 T; 0 OTHER;

```
CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTGATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGATC
AGTCTGATTG CGGCGTTAGC GGTAGATCGC GTTATCGGCA TGGAAAACGC CATGCCGTGG
AACCTGCCTG CCGATCTCGC CTGGTTTAAA CGCAACACCT TAAATAAACC CGTGATTATG
GGCCGCCATA CCTGGGAATC AATCGGTCGT CCGTTGCCAG GACGCAAAAA TATTATCCTC
AGCAGTCAAC CGGGTACGGA CGATCGCGTA ACGTGGGTGA AGTCGGTGGA TGAAGCCATC
GCGGCGTGTG GTGACGTACC AGAAATCATG GTGATTGGCG GCGGTCCCGT TTATGAACAG
TTCTTGCCAA AAGCGCAAAA ACTGTATCTG ACGCATATCG ACGCAGAAGT GGAAGGCGAC
ACCCATTTCC CGGATTACGA GCCGGATGAC TEGGAATCGG TATTCAGCGA ATTCCACGAT
GCTGATGCGC AGAACTCTCA CAGCTATTGC TTTGAGATTC TGGAGCGGCG TCGGGCCGCT
ATGAATATCA TACAAGGAAA TTTAGTTGGT ACAGGTCTTA AAATCGGAAT CGTAGTAGGA
AGATTTAATG ATTTTATTAC GAGCAAGCTG CTGAGCGGAG CAGAAGATGC GCTGCTCAGA
CATGGCGTAG ACACAAATGA CATTGATGTG GCTTGGGTTC CAGGCGCATT TGAAATACCG
TTTGCTGCGA AAAAAATGGC GGAAACAAAA AAATATGATG CTATTATCAC ATTGGGCACT
GTCATCAGAG GCGCAACGAC ACATTACGAT TATGTCTGCA ATGAAGCTGC AAAAGGCATC
GCGCAAGCAG CAAACACTAC TGGTGTACCT GTCATCTTTG GAATTGTAAC AACTGAAAAC
ATCGAACAGG CTATCGAGCG TGCCGGCACA AAAGCGGGCA ACAAAGGTGT AGATTGTGCT
GTTTCTGCCA TTGAAATGGC AAATTTAAAC CGCTCATTTG AATAATTTGG ATCCGTCGAC
CTGCAGCCAA GCTTAATTAG CTGAGCTTGG ACTCCTGTTG ATAGATCCAG TAATGACCTC
AGAACTCCAT CTGGATTTGT TCAGAACGCT CGGTTGCCGC CGGGCGTTTT TTATTGGTGA
GAATCCAAGC TAGCTTGGCG AGATTTTCAG GAGCTAAGGA AGCTAAAATG GAGAAAAAAA
TCACTGGATA TACCACCGTT GATATATCCC AATGGCATCG TAAAGAACAT TTTGAGGCAT
TTCAGTCAGT TGCTCAATGT ACCTATAACC AGACCGTTCA GCTGGATATT ACGGCCTTTT
TAAAGACCGT AAAGAAAAAT AAGCACAAGT TTTATCCGGC CTTTATTCAC ATTCTTGCCC
GCCTGATGAA TGCTCATCCG GAATTTGTA TGGCAATGAA AGACGGTGAG CTGGTGATAT
GGGATAGTGT TCACCCTTGT TACACCGTTT TCCATGAGCA AACTGAAACG TTTTCATCGC
TCTGGAGTGA ATACCACGAC GATTTCCGGC AGTTTCTACA CATATATTCG CAAGATGTGG
CGTGTTACGG TGAAAACCTG GCCTATTTCC CTAAAGGGTT TATTGAGAAT ATGTTTTTTCG
TCTCAGCCAA TCCCTGGGTG AGTTTCACCA GTTTTGATTT AAACGTGGCC AATATGGACA
ACTTCTTCGC CCCCCTTTTC ACCATGCATG GGCAATATT ATACGCAAGG CGACAAGGTG
CTGATGCCGC TGGCGATTCA GGTTCATCAT GCCGTCTGTG ATGGCTTCCA TGTCGGCAGA
ATGCTTAATG AATTACAACA GTACTGCGAT GAGTGGCAGG GCGGGGCGTA ATTTTTTTAA
GGCAGTTATT GGTGCCCTTA AACGCCTGGG GTAAAGACTC TCTAGCTTGA GGCATCAAAT
AAAACGAAAG GCTCAGTCGA AAGACTGGGC CTTTCGTTTT ATCTGTTGTT TGTCGGTGAA
CGCTCTCCTG AGTAGGACAA ATCCGCCGCT CTAGAGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA
CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA
TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC CTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC
AGCCATGACC CAGTCACGTA GCGATAGCGG AGTGATATACT GGCTTAACTA TGCGGCATCA
GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CCGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG
```


AGAAAATACC GCATCAGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC
TGTCGGGCTGC GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA
TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT
AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA
AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAACC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT
CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG
TCCGCCTTTC FCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCACGCTG TAGGTATCTC
AGTTCGGTGT AGGTCGTTCT CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC
GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA
TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT
ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTA ACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC
TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA
CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA
AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGAACGAA
AACTCACGTT AAGGGATTTT GGT CATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT
TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC
AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC
ATAGCTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC
CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA
AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC
CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC
AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA
TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT GTGCAAAAAA
GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC AGTGTTATCA
CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT
TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGATATGC GCGACCGAGT
TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTAAAAGTG
CTCATCATTC GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AACTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA
TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGACCCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC
AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG AATAAGGGCG
ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG
GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG
GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG
ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTTC GTCTTCAC//

SEQ ID No.11: pNCO-EC-MBP-BS-Lusy

pNCO-N-BS-Lusy mit Gen für das Maltose bindende Protein (MBP) aus Escherichia coli

SEQUENCE 5064 BP; 1385 A; 1189 C; 1250 G; 1240 T; 0 OTHER;

```
CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTGATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAA
ATCGAAGAAG GTAAACTGGT AATCTGGATT AACGGCGATA AAGGCTATAA CGGTCTCGCT
GAAGTCGGTA AGAAATTCTG GAAAGATACC GGAATTAAAG TCACCGTTGA GCATCCGGAT
AACTGGAAG AGAAATTCCC ACAGGTTGCG GCAACTGGCG ATGGCCCTGA CATTATCTTC
TGGGCACACG ACCGCTTTGG TGGCTACGCT CAATCTGGCC TGTTGGCTGA AATCACCCCG
GACAAAGCGT TCCAGGACAA GCTGTATCCG TTTACCTGGG ATGCCGTACG TTACAACGGC
AAGCTGATTG CTTACCCGAT CGCTGTTGAA GCGTTATCGC TGATTTATAA CAAAGATCTG
CTGCCGAACC CGCCAAAAAC CTGGGAGAGG ATCCCGGCGC TGGATAAAGA ACTGAAAGCG
AAAGGTAAGA GCGCGCTGAT GTTCAACCTG CAAGAACCGT ACTTCACCTG GCCGCTGATT
GCTGCTGACG GGGGTTATGC GTTCAAGTAT GAAAACGGCA AGTACGACAT TAAAGACGTG
GGCGTGGATA ACGCTGGCGC GAAAGCGGGT CTGACCTTCC TGGTTGACCT GATTAAAAAC
AAACACATGA ATGCAGACAC CGATTACTCC ATCGCAGAAG CTGCCTTTAA TAAAGGCGAA
ACAGCGATGA CCATCAACGG CCCGTGGGCA TGGTCCAACA TCGACACCAG CAAAGTGAAT
TATGGTGTA CCGTACTGCC GACCTTCAAG GGTCAACCAT CCAAACCGTT CGTTGGCGTG
CTGAGCGCAG GTATTAACGC CGCCAGTCCG AACAAAGAGC TGGCAAAAGA GTTCCTCGAA
AACTATCTGC TGA CTGATGA AGGTCTGGAA GCGGTTAATA AAGACAAACC GCTGGGTGCC
GTAGCGCTGA AGTCTTACGA GGAAGAGTTG GCGAAAGATC CACGTATTGC CGCCACCATG
GAAAACGCCC AGAAAGGTGA AATCATGCCG AACATCCCGC AGATGTCCGC TTTCTGGTAT
GCCGTGCGTA CTGCGGTGAT CAACGCCGCC AGCGGTCGTC AGACTGTCGA TGAAGCCCTG
AAAGACGCGC AGACTAATTC GAGCTCGAAC AACAAACAATA ATAACAATA CAACAACCTC
GGGATCGAGG GAAGGATTTT AGAATTCGCG GCCGCTATGA ATATCATACA AGGAAATTTA
GTTGGTACAG GTCTTAAAAT CGGAATCGTA GTAGGAAGAT TTAATGATTT TATTACGAGC
AAGCTGCTGA GCGGAGCAGA AGATGCGCTG CTCAGACATG GCGTAGACAC AAATGACATT
GATGTGGCTT GGGTTCCAGG CGCATTTGAA ATACCGTTTG CTGCGAAAAA AATGGCGGAA
ACAAAAAAT ATGATGCTAT TATCACATTG GGCCTGTCA TCAGAGGCGC AACGACACAT
TACGATTATG TCTGCAATGA AGCTGCAAAA GGCATCGCGC AAGCAGCAAA CACTACTGGT
GTACCTGTCA TCTTTGGAAT TGTAACAACCT GAAACATCG AACAGGCTAT CGAGCGTGCC
GGCACAAAAG CGGGCAACAA AGGTGTAGAT TGTGCTGTTT CTGCCATTGA AATGGCAAAT
TTAAACCGCT CATTTGAATA ATTTGGATCC GTCGACCTGC AGCCAAGCTT AATTAGCTGA
GCTTGGACTC CTGTTGATAG ATCCAGTAAT GACCTCAGAA CTCCATCTGG ATTTGTTTCA
AACGCTCGGT TGCCGCCGGG CGTTTTTTAT TGGTGAGAAT CCAAGCTAGC TTGGCGAGAT
TTTCAGGAGC TAAGGAAGCT AAAATGGAGA AAAAATCAC TGGATATACC ACCGTTGATA
TATCCAATG GCATCGTAAA GAACATTTTG AGGCATTTCA GTCAGTTGCT CAATGTACCT
ATAACCAGAC CGTTCAGCTG GATATTACGG CTTTTTTAAA GACCGTAAAG AAAAATAAGC
ACAAGTTTTA TCCGGCCTTT ATTCACATTC TTGCCCCCCT GATGAATGCT CATCCGGAAT
TTCGTATGGC AATGAAGAGC GGTGAGCTGG TGATATGGGA TAGTGTTCAC CTTGTTTACA
CCGTTTTCCA TGAGCAAACT GAAACGTTTT CATCGCTCTG GAGTGAATAC CACGACGATT
```


TCCGGCAGTT TCTACACATA TATTCCCAAG ATGTGGCGTG TTACGGTGAA AACCTGGCCT
ATTTCCCTAA AGGGTTTATT GAGAATATGT TTTTCGTCTC AGCCAATCCC TGGGTGAGTT
TCACCAGTTT TGATTTAAAC GTGGCCAATA TGGACAACCT CTTGCCCCC GTTTTCACCA
TGCATGGGCA AATATTATAC GCAAGGCGAC AAGGTGCTGA TGCCGCTGGC GATTCAGGTT
CATCATGCCG TCTGTGATGG CTTCCATGTC GGCAGAATGC TTAATGAATT ACAACAGTAC
TGCGATGAGT GGCAGGGCGG GGCCTAATTT TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG
CCTGGGGTAA TGACTCTCTA GCTTGAGGCA TCAAATAAAA CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA
CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTGTTGTC GGTGAACGCT CTCCTGAGTA GGACAAATCC
GCCGCTCTAG AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA
GGGCGCGTCA GCGGGTGTTG GCGGGTGTCG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA
TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC
CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT
TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTGTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA
GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC
ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT
TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG
CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC
TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC
GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC
AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC
TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT
AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT
AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT
TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG
ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC
ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA
TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG CTGCCTGACT CCCCCTCGTG
TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA
GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG
CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA
GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC
ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA
AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCCG
ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCGAGT TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT
AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGAAGGTGA GTACTCAACC
AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACCG
GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAGTGCTCA TCATTGGAA ACGTTCTTCG
GGGCGAAGAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT
GCACCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA

GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT TCCCCGAAAA
 GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT
 ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAC//

SEQ ID No.12: pNCO-BS-LuSy-EC-DHER

pNCO-C-BS-LuSy mit Gen für die Dihydrofolatreduktase aus Escherichia coli.

SEQUENCE 4380 BP; 1161 A; 1022 C; 1086 G; 1111 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAATTT AAACCGCTCA TTTGAATTAG CGGCCGCTGG TGGAGGCGGA
 ATGATCAGTC TGATTGCGGC GTTAGCGGTA GATCGCGTTA TCGGCATGGA AAACGCCATG
 CCGTGGAACC TGCCTGCCGA TCTCGCCTGG TTTAAACGCA ACACCTTAA TAAACCGTG
 ATTATGGGCC GCCATACCTG GGAATCAATC GGTGCTCCGT TGCCAGGACG CAAAAATATT
 ATCCTCAGCA GTCAACCGGG TACGGACGAT CGCGTAACGT GGGTGAAGTC GGTGGATGAA
 GCCATCGCGG CGTGTGGTGA CGTACCAGAA ATCATGGTGA TTGGCGGCGG TCGCGTTTAT
 GAACAGTTCT TGCCAAAAGC GCAAAAATCT TATCTGACGC ATATCGACGC AGAAGTGGA
 GCGACACCC ATTTCCCGGA TTACGAGCCG GATGACTGGG AATCGGTATT CAGCGAATTC
 CACGATGCTG ATGCGCAGAA CTCTCACAGC TATTGCTTTG AGATTCTGGA GCGGCGGTAA
 GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTTAAAT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC
 AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT
 TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA
 TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC
 ATTTTGAGGC ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
 TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC
 ACATTCTTGC CCGCCTGATG AATGCTCATC CGGAATTTTC TATGGCAATG AAAGACGGTG
 AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTACCCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
 CGTTTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACCACG AGGATTTCCG GCAGTTTCTA CACATATATT
 CGCAAGATGT GCGGTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA

ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTTGAT TTAAACGTGG
CCAATATGGA CAACTTCTTC GCCCCCGTTT TCACCATGCA TGGGCAAATA TTATACGCAA
GGCGACAAGG TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTTCATC ATGCCGTCTG TGATGGCTTC
CATGTCGGCA GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGGCG
TAATTTTTTT AAGGCAGTTA TTGGTGCCCT TAAACGCCTG GGGTAATGAC TCTCTAGCTT
GAGGCATCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTC GAAAGACTGG GCCTTTCGTT TTATCTGTTG
TTTGTGCGTG AACGCTCTCC TGAGTAGGAC AAATCCGCCG CTCTAGAGCT GCCTCGCGCG
TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG
GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC
TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC
AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTCCTCGCT CACTGACTCG
CTGCGCTCGG TCTGTGCGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
GCCAGGAACC GTAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA ATGCTCACGC
TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
CCCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA
GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT
ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT
CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
ACCTAGATCC FTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA
TTTCGTTCAT CCATAGCTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC
TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT
TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT
AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACAG CTCGTCGTTT
GGTATGGCTT CATTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG
TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC
GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACGAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG
CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA
ACTTTAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTCT AAGGATCTTA
CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT
TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA

AGCATTATC AGGGTTATG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT
 AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCTC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC
 ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAC//

SEQ ID No.13: pNCO-N-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den
 N-Terminus der Lumazinsynthase aus B. subtilis

SEQUENCE 3936 BP; 1049 A; 914 C; 960 G; 1013 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGGGG
 GACGGTGCTG TTCAGCCGGA CGGTGGTCAG CCGGCTGTTC GTAACGAACG TATGAATATC
 ATACAAGGAA ATTTAGTTGG TACAGGTCTT AAAATCGGAA TCGTAGTAGG AAGATTTAAT
 GATTTTATTA CGAGCAAGCT GCTGAGCGGA GCAGAAGATG CGCTGCTCAG ACATGGCGTA
 GACACAAATG ACATTGATGT GGCTTGGGTT CCAGGCGCAT TTGAAATACC GTTTGCTGCG
 AAAAAAATGG CGGAAACAAA AAAATATGAT GCTATTATCA CATTGGGCAC TGTCATCAGA
 GGCGCAACGA CACATTACGA TTATGTCTGC AATGAAGCTG CAAAAGGCAT CGCGCAAGCA
 GCAAACACTA CTGGTGTACC TGTCATCTTT GGAATTGTAA CAACTGAAAA CATCGAACAG
 GCTATCGAGC GTGCCGGCAC AAAAGCGGGC AACAAAGGTG TAGATTGTGC TGTTTCTGCC
 ATTGAAATGG CAAATTTAAA CCGCTCATTT GAATAAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
 TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
 GGATTTGTTC AGAACGCTCG GTTGCCGCCG GCGGTTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
 GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAATC ACTGGATATA
 CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATTT CAGTCAGTTG
 CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTTA AAGACCGTAA
 AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTCACAT TCTTGCCCGC CTGATGAATG
 CTCATCCGGA ATTTCTGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTT
 ACCCTTGTTA CACCGTTTTT CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
 ACCACGACGA TTTCGGGCAG TTTCTACACA TATATTGCGA AGATGTGGCG TGTTACGGTG
 AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTTTCGTC TCAGCCAATC
 CCTGGGTGAG TTTCACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC TTCTTCGCCC
 CCGTTTTTAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
 GCGATTCAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
 TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTTAAGG CAGTTATTGG
 TGCCCTTAAA CGCCTGGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
 TCAGTCGAAA GACTGGGCCT TTCGTTTTAT CTGTTGTTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
 TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CCGCGGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
 CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG
 ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TCGCGGGTGT CCGGGCGCAG CCATGACCCA

GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCGG
CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCCA CCGCTGCGCC
TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
AAGTGGTGGC CTAACCTACG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA
TGAAGTTTAA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGCTGCCTGA
CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA
ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCC CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC
ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC GGTAGCTCC
TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCGAG TGTTATCACT CATGGTTATG
GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCCG
GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTTGA
AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTGATG
TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
AAAAATAGGC STATCACGAG GCCCTTTCGT CTTCAC//

SEQ ID No.14: pNCO-C-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *B. subtilis*

SEQUENCE 3932 BP; 1046 A; 915 C; 958 G; 1013 T; 0 OTHER;

```
CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCT AAACCGTTCT TTCGAAGGTG ACGGTGCTGT TCAGCCGGAC
GGTGGTCAGC CGGCTGTTCT TAACGAACGT TAGGATCCGT CGACCTGCAG CCAAGCTTAA
TTAGCTGAGC TTGGACTCCT GTTGATAGAT CCAGTAATGA CCTCAGAACT CCATCTGGAT
TTGTTTCAGAA CGCTCGGTTG CCGCCGGGCG TTTTTTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT
GGCGAGATTT TCAGGAGCTA AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC
CGTTGATATA TCCCAATGGC ATCGTAAAGA ACATTTTGAG GCATTTTCAGT CAGTTGCTCA
ATGTACCTAT AACCAGACCG TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA
AAATAAGCAC AAGTTTTATC CGGCCTTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA
TCCGGAATTT CGTATGGCAA TGAAAGACGG TGAGCTGGTG ATATGGGATA GTGTTCACCC
TTGTTACACC GTTTTCCATG AGCAAACCTGA AACGTTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA
CGACGATTTT CGGCAGTTTC TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT ACGGTGAAAA
CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG
GGTGAGTTTC ACCAGTTTTG ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACTTCT TCGCCCCCGT
TTTCACCATG CATGGGCAAA TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG CCGCTGGCGA
TTCAGGTTCA TCATGCCGTC TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT AATGAATTAC
AACAGTACTG CGATGAGTGG CAGGGCGGGG CGTAATTTTT TTAAGGCAGT TATTGGTGCC
CTTAAACGCC TGGGGTAATG ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAAACG AAAGGCTCAG
TCGAAAGACT GGGCCTTTCT TTTTATCTGT TGTTTGTCGG TGAACGCTCT CCTGAGTAGG
ACAAATCCGC CGCTCTAGAG CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA
CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA
GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC GGGTGTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA
CGTAGCGATA GCGGAGTGTA TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA
GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA TACCGCATCA
GGCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGGCGAG
CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG
GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC
TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAATCGA CGCTCAAGTC
AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCTCCCT GGAAGCTCCC
TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
```



```

CGGGAAGCGT GCGGCTTTCT CAATGCTCAC GGTGTAGGTA TCTCAGTTCC GTGTAGGTCG
TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAA CCCCCGTTCA GCGCGACCGC TGCGCCTTAT
CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCCG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG
CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT
GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
CAGTTACCTT CGGAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA
GCGGTGGTTT TTTTGTGTTG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG
ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACC CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGA
TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA
GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTTCGTT ATCCATAGCT GCCTGACTCC
CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA
GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT
GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG
CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTGGT TTGGTATGGC TTCATTACAG TCCGGTTCCC
AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTGTCAG AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG
GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG
CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT
ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT
CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC
GTTCTTCGGG GCGAAAACCT TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC
CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG
CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA
TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA
GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG CGCACATTTT
CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA
ATAGGCGTAT CACGAGGCCC TTTCGTCTTC AC//

```

SEQ ID No.15: pNCO-N/C-VP2-BS-Lusy

Fusion eines Teils des VP2 Oberflächenproteins des 'minc enteritis Virus' an den N- und an den C-Terminus der Lumazinsynthase aus *B. subtilis*

SEQUENCE 3989 BP; 1055 A; 928 C; 981 G; 1025 T; 0 OTHER;

```

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGGGG
GACGGTGCTG TTCAGCCGGA CGGTGGTCAG CCGGCTGTTT GTAACGAACG TATGAATATC
ATACAAGGAA ATTTAGTTGG TACAGGTCTT AAAATCGGAA TCGTAGTAGG AAGATTTAAT
GATTTTATTA CGAGCAAGCT GCTGAGCGGA GCAGAAGATG CGCTGCTCAG ACATGGCGTA

```

GACACAAATG ACATTGATGT GGCTTGGGTT CCAGGCGCAT TTGAAATACC GTTTGCTGCG
 AAAAAAATGG CGGAAACAAA AAAATATGAT GCTATTATCA CATTGGGCAC TGTCATCAGA
 GGCGCAACGA CACATTACGA TTATGTCTGC AATGAAGCTG CAAAAGGCAT CGCGCAAGCA
 GCAAACACTA CTGGTGTACC TGTCATCTTT GGAATTGTAA CAACTGAAAA CATCGAACAG
 GCTATCGAGC GTGCCGGCAC AAAAGCGGGC AACAAAGGTG TAGATTGTGC TGTTCCTGCC
 ATTGAAATGG CAAACTTAAA CCGTTCTTTC GAAGGTGACG GTGCTGTTCA GCCGGACGGT
 GGTCAGCCGG CTGTTTCGTAA CGAACCTTAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA AGCTTAATTA
 GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA TCTGGATTTG
 TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG CTAGCTTGGC
 GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTTAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT
 TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG TTGCTCAATG
 TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG TAAAGAAAAA
 TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA ATGCTCATCC
 GGAATTTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG TTCACCCTTG
 TTACACCGTT TTCCATGAGC AAAGTGAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCACGA
 CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG GTGAAAACCT
 GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT
 GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG CCCCCGTTTT
 CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG CTGGCGATTC
 AGGTTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT GAATTACAAC
 AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT TGGTGCCCTT
 AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA GGCTCAGTCG
 AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT GAGTAGGACA
 AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC
 ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC
 CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT
 AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC
 GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGGCTCGGT CTGTCGGCTG CGGCGAGCGG
 TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
 AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG
 CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAA CCGGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCTGGA AGCTCCCTCG
 TCGGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG
 GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTCAGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT
 GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG
 GTAACATATC TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT
 GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG
 TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
 GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC
 CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACCTACGT TAAGGGATTT

TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA AAATGAAGTT
 TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGASTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA-
 GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGCTGCC TGACTCCCCG
 TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGGT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC
 CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC
 GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
 CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC
 GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC
 CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT
 CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGATGTC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA
 TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
 CTTGCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC ATGTAACCCA
 CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAA TGTTGAATAC
 TCATACTCTT CCTTTTTC AA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC
 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA
 GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No 16: pNCO-C-Biotag-BS-Lusy

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit biotinylierfähigem Peptid am C-Terminus

SEQUENCE 3927 BP; 1048 A; 915 C; 955 G; 1009 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAATAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACTT AAACCGTTCT TTGGAAGCG CCGCACTCGG CGGCATCTTC
 GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTAAGGA TCGGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC
 TGAGCTTGGT CTCCTGTTGA TAGATCCAGT AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTGTGTT
 CAGAACGCTC GGTGCGCGC GGGCGTTTTT TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGCGCA

GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAATGG AGAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG
 ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA
 CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA
 AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCACA TTCTTGCCCC CCTGATGAAT GCTCATCCGG
 AATTTTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT
 ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG
 ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATATTGCG AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG
 CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA
 GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA
 CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCGATTCAG
 GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG
 TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA
 AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA
 TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT
 GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGCTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
 TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG
 CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC
 TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA
 TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
 TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG
 TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG
 CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA
 AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG
 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT
 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT
 GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
 CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT
 ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
 GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAAAGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG
 GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT
 AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT
 GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC
 GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC
 GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG
 GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA
 GGCATCGTGG TGTACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA
 TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCGGTCCT

CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG
 CATAATTCTC TTAGTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TGTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA
 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT
 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGC AAATGCCGC AAAAAAGGGG ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC
 ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No.17: pNCO-BS-Lusy-Lys165

Lumazinsynthase aus *B. subtilis* mit Peptid (G4S-G3S-G-Lysin) am C-Terminus

SEQUENCE 3912 BP; 1042 A; 906 C; 953 G; 1011 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
 ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
 AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
 GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
 GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
 AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAGG CATCGCGCAA
 GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
 CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT AAACCGTTCT TTCGAAGGTG GCGGTGGTTC TGGTGGTGGC
 TCTGGTAAAT AAGGATCCGT CGACCTGCAG CCAAGCTTAA TTAGCTGAGC TTGGAATCCT
 GTTGATAGAT CCAGTAATGA CCTCAGAACT CCATCTGGAT TTGTTGAGAA CGCTCGGTTG
 CCGCCGGGCG TTTTTTATTG GTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGCGAGATTT TCAGGAGCTA
 AGGAAGCTAA AATGGAGAAA AAAATCACTG GATATACCAC CGTTGATATA TCCAATGGC
 ATCGTAAAGA ACATTTTGAG GCATTTTCACT CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAGACCG
 TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA CCGTAAAGAA AAATAAGCAC AAGTTTTATC
 CGGCCTTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA TGAATGCTCA TCCGGAATTT CGTATGGCAA
 TGAAAGACGG TGAGCTGGTG ATATGGGATA GTGTTACACC TTGTTACACC GTTTTCCATG
 AGCAAACCTGA AACGTTTTCA TCGCTCTGGA GTGAATACCA CGACGATTTT CCGCAGTTTC
 TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG
 GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG CCAATCCCTG GGTGAGTTTC ACCAGTTTTC
 ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACTTCT TCGCCCCCGT TTTCACCATG CATGGGCAAA
 TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG CCGCTGGCGA TTCAGGTTCA TCATGCCGTC
 TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG

CAGGGCGGGG CGTAATTTTT TTAAGSCAGT TATTEGTGCC CTTAAACGCC TGGGGTAATG
 ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AATAAAACG AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTTTCG
 TTTTATCTGT TGT TTGTGG TGAACGCTCT CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CGCTCTAGAG
 CTGCCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC
 GGTCACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC
 GGGTGTGGG GGGTGTGGG GCGCAGCCAT GACCCAGTCA CGTAGCGATA GCGGAGTGTA
 TACTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT
 GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAA TACCGCATCA GCGGCTCTTC CGCTTCCTCG
 CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTGTGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
 GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAG GCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCTCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG
 ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGGCTTTCT
 CAATGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTGG GTGTAGGTGG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT
 GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCGCGACCGC TCGCGCTTAT CCGGTAACCTA TCGTCTTGAG
 TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC
 ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTGTTGC
 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG
 GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACCTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT
 ATATATGAGT AACTTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
 GCGATCTGTC TATTTTCGTTT ATCCATAGCT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG
 ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA
 CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT
 AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTACAG TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA
 TGATCCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA
 AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
 GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA
 GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG
 CCACATAGCA GAACCTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACCTC
 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA
 TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TGTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
 GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGGACACGG AATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT
 CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG CGCACATTTT CCGGAAAAGT GCCACCTGAC
 GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCCC
 TTTCGTCTTC AC//

SEQ ID No.18: pNCO-BS-Lusy-Cys167

Lumazinsynthase aus *B. subtilis* mit Peptid (G4S-G3S-G3-CYSTEIN) am C-Terminus

SEQUENCE 3919 BP; 1039 A; 909 C; 958 G; 1013 T; 0 OTHER;

```

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCT AAACCGTTCT TTCGAAGGTG GCGGTGGTTC TGGTGGTGGC
TCTGGTGGTG GCTGCTAAGG ATCCCGTCCA CCTGCAGCCA AGCTTAATTA GCTGAGCTTG
GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA TCTGGATTTG TTCAGAACGC
TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG CTAGCTTGGC GAGATTTTCA
GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT TGATATATCC
CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG TTGCTCAATG TACCTATAAC
CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG TAAAGAAAAA TAAGCACAAG
TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA ATGCTCATCC GGAATTTTCGT
ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG TTCACCTTG TTACACCGTT
TTCCATGAGC AAACCTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCACGA CGATTTCCGG
CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG GTGAAAACCT GGCCTATTTT
CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT GAGTTTCACC
AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG CCCCCGTTTT CACCATGCAT
GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG CTGGCGATTC AGGTTTCATCA
TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT GAATTACAAC AGTACTGCGA
TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT TGGTGCCCTT AAACGCCTGG
GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG
CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT GAGTAGGACA AATCCGCCGC
TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC
CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG
CGTCAGCGGG TGTGGCGGGG TGTGGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTAGTGAGAG TGCACCATAT
GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC
TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCCTCGGT CTGTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA
CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG
AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA
CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC
TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT

```

GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG
 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG
 GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA
 CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
 AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT
 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 TTCTACGGGG TGTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCAGCT TAAGGGATTT TGGTCATGAG
 ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGCTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT
 AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG
 AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG
 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT
 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG
 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC
 TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA
 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGGCG
 AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTTC ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG
 GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
 CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC
 ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GCGGTATCAC
 GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.19: pFLAG-MAC-BS-Lusy

Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis* mit Peptid (MDYKDDDDKVKL) am N-Terminus
 SEQUENCE 5531 BP; 1346 A; 1411 C; 1449 G; 1325 T; 0 OTHER;

CATCATAACG GTTCTGGCAA ATATTCTGAA ATGAGCTGTT GACAATTAAT CATCGGCTCG
 TATAATGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACACA GGAGATATCT TATGGACTAC
 AAGGACGACG ATGACAAAGT CAAGCTTATG AATATCATAC AAGGAAATTT AGTTGGTACA
 GGTCTTAAAA TCGGAATCGT AGTAGGAAGA TTTAATGATT TTATTACGAG CAGCTGCTG
 AGCGGAGCAG AAGATGCGCT GCTCAGACAT GCGGTAGACA CAAATGACAT TGATGTGGCT
 TGGGTTCCAG GCGCATTTGA AATACCGTTT GCTGCGAAAA AAATGGCGGA AACAAAAAA
 TATGATGCTA TTATCACATT GGGCACTGTC ATCAGAGGCG CAACGACACA TTACGATTAT

GTCTGCAATG AAGCTGCAAA AGGCATCGCG CAAGCAGCAA ACACTACTGG TGTACCTGTC
ATCTTTGGAA TTGTAACAAC TGAACACATC GAACAGGCTA TCGAGCGTGC CGGCACAAAA
GCGGGCAACA AAGGTGTAGA TTGTGCTGTT TCTGCCATTG AAATGGCAAA CTTAAACCGT
TCTTTCGAAT AAGAATTCCC GGGTACCTGC AGATCTAGAT AGATGAGCTC GTCGAGTGAG
AGAAGATTTT CAGCCTGATA CAGATTAAAT CAGAAGCGGT CTGATAAAAC AGAATTTGCC
TGGCGGCAGT AGCGCGGTGG TCCCACCTGA CCCCATGCCG AACTCAGAAG TGAAACGCCG
TAGCGCCGAT GGTAGTGTGG GGTCTCCCA TGCGAGAGTA GGGAACTGCC AGGCATCAAA
TAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA
ACGCTCTCCT GAGTAGGACA AATCCGCCGG GAGCGGATTT GAACGTTGCG AAGCAACGGC
CCGGAGGGTG GCGGGCAGGA CGCCCGCCAT AACTGCCAG GCATCAAATT AAGCAGAAGG
CCATCCTGAC GGATGGCCTT TTTGCGTTTC TACAACTCT TTTGTTTATT TTTCTAAATA
CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA ATAATATTGA
AAAAGGAAGA GTATGAGTAT TCAACATTTT CGTGTGCCCC TTATTCCCTT TTTTGCGGCA
TTTTGCCTTC CTGTTTTTGC TCACCCAGAA ACGCTGGTGA AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT
CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTAA GATCCTTGAG
AGTTTTCGCC CCGAAGAACG TTTTCCAATG ATGAGCACTT TTAAAGTTCT GCTATGTGGC
GCGGTATTAT CCCGTGTTGA CGCCGGGCAA GAGCAACTCG GTCGCCGCAT ACACTATTCT
CAGAATGACT TGGTTGAGTA CTCACCAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA
GTAAGAGAAT TATGCAGTGC TGCCATAACC ATGAGTGATA AACTGCGGC CAACTTACTT
CTGACAACGA TCGGAGGACC GAAGGAGCTA ACCGCTTTTT TGCACAACAT GGGGGATCAT
GTAACTCGCC ATGATCGTTG GGAACCGGAG CTGAATGAAG CCATACCAA CGACGAGCGT
GACACCACGA TGCTGTAGC AATGGCAACA ACGTTGCGCA AACTATTAAC TGGCGAACTA
CTTACTCTAG CTTCCCGGCA ACAATTAATA GACTGGATGG AGGCGGATAA AGTTGCAGGA
CCACTTCTGC GCTCGGCCCT TCCGGCTGGC TGGTTTATTG CTGATAAATC TGGAGCCGGT
GAGCGTGGGT CTCGCGGTAT CATTGCAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC CTCCCGTATC
GTAGTTATCT ACACGACGGG GAGTCAGGCA ACTATGGATG AACGAAATAG ACAGATCGCT
GAGATAGGTG CCTCACTGAT TAAGCATTGG TAACTGTCAG ACCAAGTTTA CTCATATATA
CTTTAGATTG ATTTAAAACT TCATTTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT
GATAATCTCA TGACCAAAAT CCCTTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC
GTAGAAAAGA TCAAAGGATC TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG
CAAACAAAAA AACCACCGCT ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT
CTTTTTCCGA AGGTAACCTG CTTACAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG
TAGCCGTAGT TAGGCCACCA CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG
CTAATCCTGT TACCAGTGGC TGCTGCCAGT GCGGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTGGAC
TCAAGACGAT AGTTACCGGA TAAGGCGCAG CGGTGCGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA
CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA
GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA AGGGAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC
GGAACAGGAG AGCGCACGAG GGAGCTTCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT
GTCGGGTTC GCCACCTCTG ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG
AGCCTATGGA AAACGCCAG CAACGCGGCC TTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT
TTTGCTCACA TGTCTTTCC TGCCTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC
TTTGAGTGAG CTGATACCGC TCGCCGCAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA GTCAGTGAGC

GAGGAAGCGG AAGAGCGCCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG CCGTATTTCA
CACCGCAGAT CCTGACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGETTAC
GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTTCG CTTTCTTCCC
TTCCTTTCTC GCCACGTTTCG CCGGCTTTTC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTTT
AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCCAA AACTTGATT AGGGTGATGG
TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTTCG CTTTGACGT TGGAGTCCAC
GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC TGGAAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA
TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT
TTAACAAAAA TTTAACGCGA ATTTTAAACA AATATTAACG TTTACAGGAT CTAATGAGGG
GACGACGACA GTATCGGCCT CAGGAAGATC GCACTCCAGC CAGCTTTCCG GCACCGCTTC
TGGTGCCGGA AACCAGGCAA AGCGCCATTC GCCATTCAGG CTGCGCAACT GTTGGGAAGG
GCGATCGGTG CGGGCCTCTT CGCTATTACG CCAGCTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG
GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTTC CCAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG
TGAATCCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC
CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT
AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC
AGCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCCAGG
GTGGTTTTTC TTTTCACCAG TGAGACGGGC AACAGCTGAT TGCCCTTCAC CGCCTGGCCC
TGAGAGAGTT GCAGCAAGCG GTCCACGCTG GTTTGCCCCA GCAGGCGAAA ATCCTGTTTG
ATGGTGGTTG ACGGCGGGAT ATAACATGAG CTGTCTTCGG TATCGTCGTA TCCCACTACC
GAGATATCCG CACCAACGCG CAGCCCGGAC TCGGTAATGG CGCGCATTGC GCCAGCGCC
ATCTGATCGT TGGCAACCAG CATCGCAGTG GGAACGATGC CCTCATTCAG CATTTGCATG
GTTTGTGAA AACCGGACAT GGCACCTCAG TCGCCTTCCC GTTCCGCTAT CGGCTGAATT
TGATTGCGAG TGAGATATTT ATGCCAGCCA GCCAGACGCA GACGCGCCGA GACAGAACTT
AATGGGCCCC CTAAACAGCG GATTTGCTGG TGACCCAATG CGACCAGATG CTCCACGCCC
AGTCGCGTAC CGTCTTCATG GGAGAAAATA AACTGTGTA TGGGTGTCTG GTCAGAGACA
TCAAGAAATA ACGCCGGAAC ATTAGTGCAG GCAGCTTCCA CAGCAATGGC ATCCTGGTCA
TCCAGCGGAT AGTTAATGAT CAGCCCACTG ACGCGTTGCG CGAGAAGATT GTGCACCGCC
GCTTTACAGG CTTGACGCGC GCTTCGTTCT ACCATCGACA CCACCACGCT GGCACCCAGT
TGATCGGCGC GAGATTTAAT CGCCGCGACA ATTTGCGACG GCGCGTGCAG GGCCAGACTG
GAGGTGGCAA CGCCAATCAG CAACGACTGT TTGCCCGCCA GTTGTGTGTC CACGCGGTTG
GGAATGTAAT TCAGCTCCGC CATCGCCGCT TCCACTTTTT CCCGCGTTTT CGCAGAAACG
TGGCTGGCCT GGTTCAACCAC GCGGGAAACG GTCTGATAAG AGACACCGGC AACTCTGCG
ACATCGTATA ACGTTACTGG TTTCACATTC ACCACCCTGA ATTGACTCTC TTCCGGGCGC
TATCATGCCA TACCGCGAAA GGTTTTGCAC CATTCCATGG TGTCGAATTG CTGCAGGTCTG
AGGGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT
GTCTGCTCCC GGCATCCGCT TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC
AGAGGTTTTTC ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT
CCCCCGGCCA CGGGCCTGCC ACCATACCCA CGCCGAAACA AGCGCTCATG AGCCCGAAGT
GGCGAGCCCC ATCTTCCCCA TCGGTGATGT CCGCGATATA GCGCCAGCA ACCGCACCTG
TGGCGCCGGT GATGCCGGCC ACGATGCGTC CCGCGTAGAG GATCCGGAGC TTATCGACTG
CACGGTGCAC CAATGCTTCT GCGTCAGGC AGCCATCGGA AGCTGTGGTA TGGCTGTGCA

GGTCGTAAAT CACTGCATAA TTCGTGTCGC TCAAGGCGCA CTCCCGTTCT GGATAATGTT
TTTTGCGCCG A//

SEQ ID No.20: pNCO-C-His6-BS-Lusy

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* mit 6x His-Peptid am C-Terminus

SEQUENCE 3897 BP; 1045 A; 911 C; 937 G; 1004 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATAACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGTTTGCT
GCGAAAAAAA TGGCGGAAAC AAAAAATAT GATGCTATTA TCACATTGGG CACTGTCATC
AGAGGCGCAA CGACACATTA CGATTATGTC TGCAATGAAG CTGCAAAAGG CATCGCGCAA
GCAGCAAACA CTACTGGTGT ACCTGTCATC TTTGGAATTG TAACAACCTGA AAACATCGAA
CAGGCTATCG AGCGTGCCGG CACAAAAGCG GGCAACAAAG GTGTAGATTG TGCTGTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCTT AAACCGTTCT TTCGAACATC ACCATCACCA CCATTAAGGA
TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC TGAGCTTGGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT
AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTTGTT CAGAACGCTC GGTTGCCGCC GGGCGTTTTT
TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGCGCA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG
AGAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA
CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCACA
TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTTTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC
TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT
TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATATTCGC
AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA
TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA
ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC
GACAAGGTGC TGATGCCGCT GCGGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT
GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA
TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG
GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT
GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT
CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT
GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG
TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT
GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
TGCGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG

CGCTCGGTCT CTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA
 TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG
 CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT
 AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
 GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA
 CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA
 TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG
 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC
 TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT
 CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA
 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC
 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT
 ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
 TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAAGTGCAT GCCATCCGTA
 AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CCGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
 TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT
 ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA
 CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAT
 ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCC TCTTCAC//

SEQ ID No.21: pNCO-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus Aquifex aeolicus

SQ SEQUENCE 3879 BP; 1005 A; 925 C; 940 G; 1009 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA

ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
 AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
 TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
 CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
 ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
 TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
 TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
 ATGCTCATCC GGAATTTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
 TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AACTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
 AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG
 GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
 ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
 CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
 CTGGCGATTG AGGTTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
 GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
 TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
 GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
 GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
 CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
 CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
 CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT CTGTCGGCTG
 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
 TAGGTCGTTG GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACATATC TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC

GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT
 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGCTGCC
 TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCAGCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG STATGGCTTC ATTCAGCTCC
 GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTTCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.22: pNCO-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus Aquifex aeolicus mit biotinylierfähigem Peptid am C-Terminus

SQ SEQUENCE 3927 BP; 1014 A; 938 C; 958 G; 1017 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTEGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACTT ATTCAAGTCT CTCCGAGCGG CCGCACTCGG CGGCATCTTC
 GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTAAGGA TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC
 TGAGCTTGGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTTGTT

CAGAACGCTC GGTGCGGCC GGGCGTTTTT TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA
GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAATGG AGAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG
ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAAACATT TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA
CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA
AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCACA TTCTTGCCCC CCTGATGAAT GCTCATCCGG
AATTTTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT
ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAACAGT TTTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG
ATTTCCGGCA GTTTCTACAC ATATAATCGC AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAAACCTGG
CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA
GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA
CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCGATTGAG
GTTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG
TACTGCGATG AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA
AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA
TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT
GCAGCTCCCC GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC
TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG
CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCCTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC
TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA
TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG
TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG
CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA
AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC
TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCC ACCGCTGCGC CTTATCCGGT
AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT
GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT
ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG
GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT
AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT
GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC
GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC
GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG
GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA
GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TCCCAACGA

TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTC TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT
 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG
 CATAATTCTC TTA CTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA
 CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT
 TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA
 ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC
 ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA
 TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA
 AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No.23: pNCO-His6-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-terminal, über einen Linker aus 6 Histidin- und 3 Alaninresten gekoppeltem, in vivo biotinylierfähigem Peptid vorliegt

SQ SEQUENCE 3945 BP; 1020 A; 947 C; 958 G; 1020 T; 0 OTHER;
 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGACATC ACCATCACCA CCATGCGGCC
 GCACTCGGCG GCATCTTCGA AGCTATGAAG ATGGAGTGGC GCTAAGGATC CGTCGACCTG
 CAGCCAAGCT TAATTAGCTG AGCTTGGACT CCTGTTGATA GATCCAGTAA TGACCTCAGA
 ACTCCATCTG GATTTGTTCA GAACGCTCGG TTGCCGCCGG GCGTTTTTTA TTGGTGAGAA
 TCCAAGCTAG CTTGGCGAGA TTTTCAGGAG CTAAGGAAGC TAAATGGAG AAAAAAATCA
 CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCAAT GGCATCGTAA AGAACATTTT GAGGCATTTT
 AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA CCGTTCAGCT GGATATTACG GCCTTTTTAA
 AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTTT ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCCGCC
 TGATGAATGC TCATCCGGAA TTTCGTATGG CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG
 ATAGTGTTCA CCCTTGTTAC ACCGTTTTCC ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCATCGCTCT
 GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT TTCTACACAT ATATTCGCAA GATGTGGCGT

GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA AAGGGTTTAT TGAGAATATG TTTTTCGTCT
 CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT TTGATTTAAA CGTGGCCAAT ATGGACAAC-
 TCTTCGCCCC CGTTTTTCACC ATGCATGGGC AAATATTATA CGCAAGGCGA CAAGGTGCTG
 ATGCCGCTGG CGATTCAGGT TCATCATGCC GTCTGTGATG GCTTCCATGT CGGCAGAATG
 CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG GGGCGTAATT TTTTAAAGGC
 AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGGTA ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAATAAA
 ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCTTT TCGTTTTATC TGTTGTTTGT CGGTGAACGC
 TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGCTCTA GAGCTGCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG
 TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC
 CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT GCGGGGTGTC GGGGCGCAGC
 CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTATACTGGC TTAACATATG GGCATCAGAG
 CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGCGG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA
 AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT
 CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA
 GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA
 AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT
 CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCGTTTCCC
 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 GCCTTTCTCC CTTGCGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG STATCTCAGT
 TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC
 CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG
 CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTGCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA
 ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA
 GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC
 TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA
 AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT
 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCC TTCATCCATA
 GCTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC
 CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAGT GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
 TCTATTAATT GTTGCCGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC
 GTTGTTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC
 AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG
 GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC
 ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT
 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC
 TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC
 ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC
 AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC
 GTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA

CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGGT
CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA
TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTTCGTC TTCAC//

SEQ ID No.24: pNCO-His6-GLY2-SER-GLY-C-Biotag-AA-Lusy

Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* mit C-terminal, über einen Linker bestehend aus der Aminosäurefolge HHHHHHGGSGAAA gekoppeltem, in vivo biotinylierfähigem Peptid vorliegt

SQ SEQUENCE 3957 BP; 1020 A; 950 C; 964 G; 1023 T; 0 OTHER;
CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGACATC ACCATCACCA CCATGGCGGT
TCTGGCGCGG CCGCACTCGG CGGCATCTTC GAAGCTATGA AGATGGAGTG GCGCTAAGGA
TCCGTCGACC TGCAGCCAAG CTTAATTAGC TGAGCTTGGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT
AATGACCTCA GAACTCCATC TGGATTTGTT CAGAACGCTC GGTGCGGCC GGGCGTTTTT
TATTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAATGG
AGAAAAAAT CACTGGATAT ACCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA
CGGCCTTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTCACA
TTCTTGCCCG CCTGATGAAT GCTCATCCGG AATTTCTGAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC
TGGTGATATG GGATAGTGTT CACCCTTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT
TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCACGACG ATTTCCGGCA GTTCTACAC ATATATTCGC
AAGATGTGGC GTGTTACGGT GAAACCTGG CCTATTTCCC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA
TGTTTTTCGT CTCAGCCAAT CCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA
ATATGGACAA CTTCTTCGCC CCCGTTTTCA CCATGCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC
GACAAGGTGC TGATGCCGCT GGCGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA TGGCTTCCAT
GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG AGTGGCAGGG CCGGGCGTAA
TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA ACCCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG
GCATCAAATA AAACGAAAGG CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTTGTTT
GTCGGTGAAC GCTCTCCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT

CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT
GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG
TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT
GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
TGCGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG
CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA
TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC
AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG
CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT
AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
GTTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA
CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA
TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG
TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC
TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT
CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA
TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC
GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT
ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTCAT GCCATCCGTA
AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT
ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA
CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT
ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC//

SEQ ID No.25: pNCO-BS-LuSy-AgeI-AA-Lusy

Chimäre Protein bestehend aus einem Teil der Lumazinsynthese aus *Bacillus subtilis* und einem Teil der thermostabilen Lumazinsynthese aus *Aquifex aeolicus*.

SQ SEQUENCE 3879 BP; 1020 A; 914 C; 940 G; 1005 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGAAT
ATCATACAAG GAAATTTAGT TGGTACAGGT CTTAAATCG GAATCGTAGT AGGAAGATTT
AATGATTTTA TTACGAGCAA GCTGCTGAGC GGAGCAGAAG ATGCGCTGCT CAGACATGGC
GTAGACACAA ATGACATTGA TGTGGCTTGG GTTCCAGGCG CATTTGAAAT ACCGGTTGCT
GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
TCTGGATTTG TTCAGAAAGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
ATGCTCATCC GGAATTTTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACCTGAAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG
GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
CTGGCGATTC AGGTTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGGCGGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACCT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTGGGCTG
CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG

TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
 GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCAGCT
 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGCTGCC
 TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
 GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTTC
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TACTTTTAC CAGCGTTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.26: pNCO-AA-BglII-Lusy

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BglII.

SEQUENCE 3879 BP; 1004 A; 925 C; 941 G; 1009 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAG
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTCG GTATCGTAGC ATCAGTTTTT
 AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT

GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTGA TTACAGCTGA CACCTTGGAA
CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCTT ATTCAAGTCT CTCCGATAAG GATCCGTCGA CCTGCAGCCA
AGCTTAATTA GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTTGCCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG AGAATCCAAG
CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT GGAGAAAAAA ATCACTGGAT
ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG
TTGCTCAATG TACCTATAAC CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG
TAAAGAAAAA TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATTCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
ATGCTCATCC GGAATTTCTG ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG
TTCACCCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAAGTGAAC GTTTTCATCG CTCTGGAGTG
AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTAC ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTTACG
GTGAAAACCT GGCCTATTTT CCTAAAGGGT TTATTGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA
ATCCCTGGGT GAGTTTCACC AGTTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
CCCCCGTTTT CACCATGCAT GGGCAAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCCG
CTGGCGATTC AGGTTTCATCA TGCCGTCTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG AATGCTTAAT
GAATTACAAC AGTACTGCGA TGAGTGGCAG GGCGGGGCGT AATTTTTTTA AGGCAGTTAT
TGGTGCCCTT AAACGCCTGG GGTAATGACT CTCTAGCTTG AGGCATCAAA TAAAACGAAA
GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA ACGCTCTCCT
GAGTAGGACA AATCCGCCGC TCTAGAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAAA
CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG
CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC
CCAGTCACGT AGCGATAGCG GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CTGTCGGCTG
CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC
GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
GCCTTATCCG GTAAGTATCG TCTTGAGTCC AACC CGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAGTCACGT
TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTGGTCTGA CAGTTACCAA

TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGCTGCC
 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGSTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT
 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC
 TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT
 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC
 CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
 GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCCG
 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT
 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC
 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC
 TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC//

SEQ ID No.27: pNCO-AA-Lusy- (BamHI)

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den C-Terminus der thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease BamHI.

SEQUENCE 3876 BP; 1003 A; 925 C; 940 G; 1008 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAA
 ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTCGTTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
 AATCATGCTC TTGTGACCCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
 GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
 GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
 AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
 CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
 CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
 GCCATTGAAA TGGCAAACTT ATTCAAGTCT CTCCGAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
 TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
 GGATTTGTTC AGAACGCTCG GTTCCCGCCG GCGGTTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
 GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAATC ACTGGATATA
 CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATTT CAGTCAGTTG

CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTTA AAGACCGTAA
AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTCACAT TCTTGCCCGC CTGATGAATG
CTCATCCGGA ATTTTCGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTT
ACCCTTGTTA CACCGTTTTT CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTCGCA AGATGTGGCG TGTACGGTG
AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTTTCGTC TCAGCCAATC
CCTGGGTGAG TTTACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC TTCTTCGCCC
CCGTTTTTAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
GCGATTCAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTTAAGG CAGTTATTGG
TGCCCTTAAA CGCCTGGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
TCAGTCGAAA GACTGGGCCT TTCGTTTTAT CTGTTGTTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGCTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG
ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA
GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCGG
CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCGCGC
TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
AGTCAGAGGT GGCAGAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
AAGTGGTGGC CTAACACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA
TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGCTGCCTGA
CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA
ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC
ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC
TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCGC TGTTATCACT CATGGTTATG
GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT

GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCCG
GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG
TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
TGAGCAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTTAC//

SEQ ID No.28: pNCO-AA-BglII-Lusy- (BamHI)

Vektor zur Fusion von Fremdpeptiden an den N- und an den C-Terminus der
thermostabilen Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus* unter Verwendung der
Restriktionsendonukleasen BglII und BamHI.

SEQUENCE 3876 BP; 1002 A; 925 C; 941 G; 1008 T; 0 OTHER;

CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG AGGAGAAATT AACTATGCAG
ATCTACGAAG GTAAACTAAC TGCTGAAGGC CTTGTTTCG GTATCGTAGC ATCACGTTTT
AATCATGCTC TTGTCGACCG TCTGGTGGAG GGTGCAATTG ATTGCATAGT CCGTCATGGC
GGCCGTGAAG AAGACATTAC TCTGGTTCGT GTTCCAGGCT CATGGGAAAT ACCGGTTGCT
GCGGGTGAAC TGGCGCGTAA AGAGGACATT GATGCTGTTA TCGCAATTGG CGTTCTCATC
AGAGGCGCAA CGCCACATTT CGATTATATC GCCTCTGAAG TTTCAAAGG CCTCGCGAAC
CTTTCATTAG AACTACGTAA ACCTATCACC TTCGGTGTTA TTACAGCTGA CACCTTGGA
CAGGCTATCG AGCGCGCCGG CACAAAACAC GGCAACAAAG GTTGGGAAGC AGCGCTTTCT
GCCATTGAAA TGGCAAACCTT ATTCAAGTCT CTCCGAGGAT CCGTCGACCT GCAGCCAAGC
TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG AACTCCATCT
GGATTTGTTC AGAACGCTCG GTTGCCGCCG GCGTTTTTTT ATTGGTGAGA ATCCAAGCTA
GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTAAAATGGA GAAAAAATC ACTGGATATA
CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATTT CAGTCAGTTG
CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTTA AAGACCGTAA
AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTCACAT TCTTGCCCGC CTGATGAATG
CTCATCCGGA ATTTGATATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG GATAGTGTTT
ACCCTTGTTA CACCGTTTTT CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC TGGAGTGAAT
ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTCGCA AGATGTGGCG TGTTACGGTG
AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTTCGTC TCAGCCAATC
CCTGGGTGAG TTTTCACCAG TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC TTCTTCGCCC
CCGTTTTTAC CATGCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG
GCGATTCAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA

TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAT TTTTTTAAGG CAGTTATTGG
TGCCCTTAAA CGCCTGGGGT AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAAATAA AACGAAAGGC
TCAGTCGAAA GACTGGGCCT TTCGTTTTAT CTGTTGTTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGCGTTTC GGTGATGACG GTGAAAACCT
CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG
ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA
GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA
CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG TCGGCTGCGG
CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG
TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC
CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC
TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
AAGTGGTGGC CTAACACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG
AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA
TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGCTGCCTGA
CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA
ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC
ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC GGTAGCTCC
TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCGAG TGTTATCACT CATGGTTATG
GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCCG
GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG
TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT
AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTTAC//

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. September 2000 (14.09.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/53229 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/62,
15/54, 9/10, A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01899

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. März 2000 (03.03.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 10 102.7 8. März 1999 (08.03.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: FISCHER, Markus [DE/DE]; Ruppert-
strasse 10, D-80337 München (DE). BACHER, Adelbert
[DE/DE]; Königsbergerstrasse 74, D-85748 Garching
(DE).

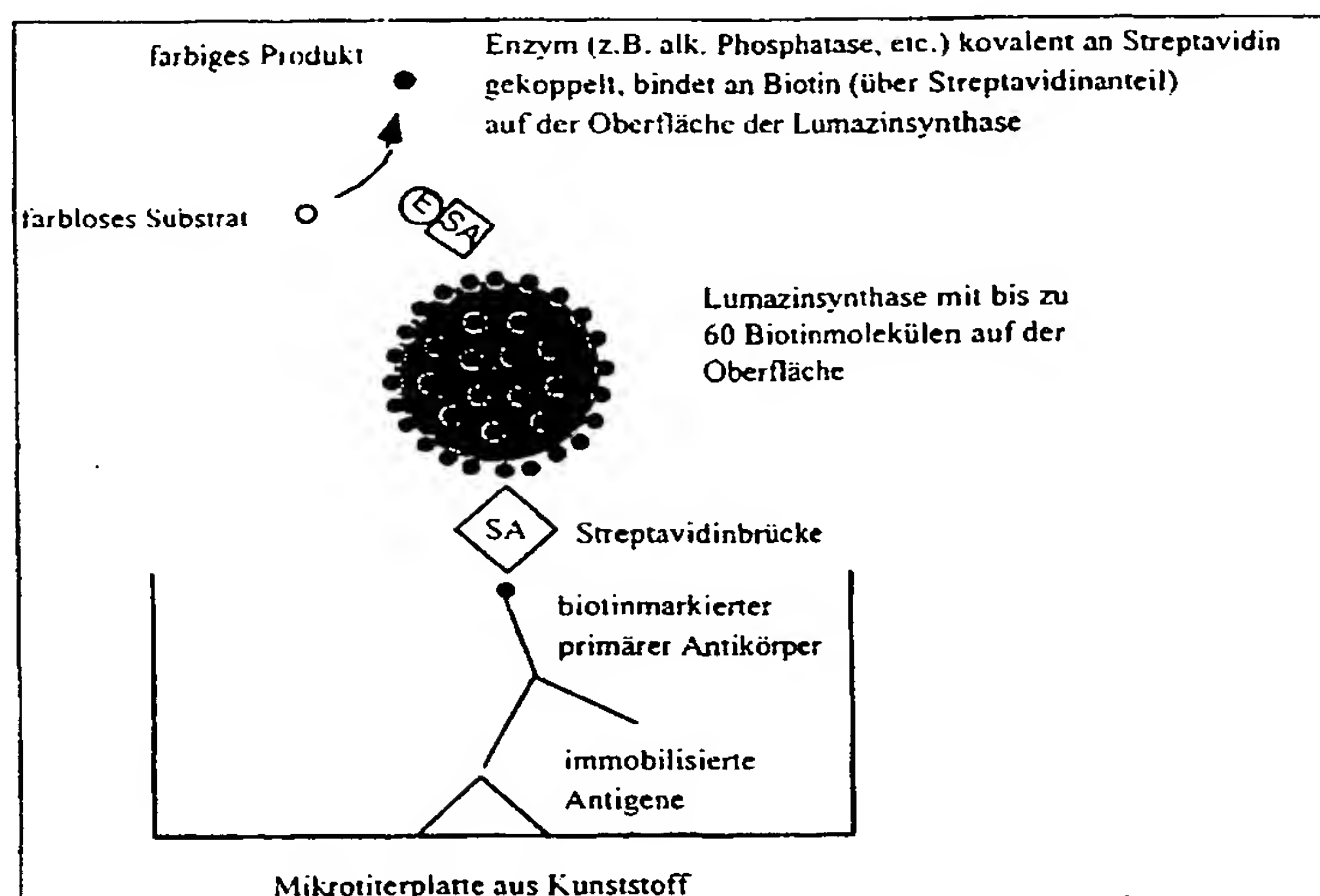
(74) Anwalt: HARTZ, Nikolai; Wächtershäuser & Hartz, Tal
29, D-80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROTEIN CONJUGATES ON THE BASIS OF LUMAZINE SYNTHASE, METHODS FOR PRODUCING THEM
AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: PROTEINKONJUGATE AUF BASIS VON LUMAZINSYNTASE, VERFAHREN ZU DEREN HERSTEL-
LUNG UND DEREN VERWENDUNG



- 1...COLOR PRODUCT
- 2...COLORLESS SUBSTRATE
- 3...ENZYME (E.G. ALK. PHOSPHATASE, ETC.) COVALENTLY BOUND TO STREPTAVIDIN BINDS TO BIOTIN (VIA STREPTAVIDIN PORTION) ON THE SURFACE OF THE LUMAZINE SYNTHASE.
- 4...LUMAZINE SYNTHASE WITH UP TO 60 BIOTIN MOLECULES ON THE SURFACE.
- 5...STREPTAVIDIN BRIDGE
- 6...STREPTAVIDIN BRIDGE
- 6...BIOTIN-LABELED PRIMARY ANTIBODY
- 7...IMMOBILIZED ANTIGEN
- 8...MICROTITER PLATE FROM SYNTHETIC MATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to protein conjugates, methods, vectors, proteins and DNA for producing them, their use, and medicaments and vaccines containing a certain quantity of said protein conjugates. According to the invention, supramolecular particles are produced that represent one or more different, randomly selectable structural units in a large number on the surface of an individual, approximately spherical protein molecule. Icosahedral lumazine synthases are used as carrier proteins for peptides or proteins. A DNA fragment that encodes a peptide molecule is fused with a DNA fragment that encodes an icosahedral lumazine synthase by molecular-biological methods. Said DNA fragment is inserted into a cloning vector and transformed with an appropriate host strain. A polypeptide is expressed by gene expression. If certain peptide structures are used as the fusion partners, a post-translational change of said structures can be observed in the host strain. The chimeric peptide is purified and chemically modified if necessary. It is possible to produce icosahedral molecules that contain up to 120 different peptide motifs on their surfaces by mixing. The compounds produced lend themselves as auxiliary agents for carrying out analytical methods (ELISA, biosensors) or for producing vaccines.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/53229 A3



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

29. November 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Proteinkonjugate, Verfahren, Vektoren, Proteine und DNA zu deren Herstellung, sowie deren Verwendung, sowie Arzneimittel oder Impfstoffe mit einem Gehalt derselben. Sie dient zur Herstellung supramolekularer Partikel, welche eine oder mehrere unterschiedliche, willkürlich bestimmbare Struktureinheiten in grosser Anzahl auf der Oberfläche eines einzelnen, etwa kugelförmigen Proteinmoleküls präsentieren. Ikosaedrische Lumazinsynthasen werden als Trägerproteine für Peptide bzw. Proteine eingesetzt. Ein DNA-Fragment, welches für ein Peptidmolekül kodiert, wird unter Verwendung molekularbiologischer Verfahren mit einem DNA-Fragment, welches für eine ikosaedrische Lumazinsynthase kodiert, fusioniert. Das DNA-Fragment wird in einen Klonierungsvektor inseriert und in einen geeigneten Wirtstamm transformiert. Auf dem Wege der Genexpression wird ein Polypeptid produziert. Bei der Verwendung von bestimmten Peptidstrukturen als Fusionspartner erfolgt im Wirtstamm eine posttranslationale Veränderung derselben. Das chimäre Peptid wird gereinigt und bei Bedarf chemisch verändert. Desweiteren können durch Vermischung ikosaedrische Moleküle hergestellt werden, die bis zu 120 unterschiedliche Peptidmotive auf deren Oberfläche enthalten. Die entstandenen Verbindungen eignen sich als Hilfsmittel zur Durchführung von Analysenverfahren (ELISA, Biosensoren) oder zur Herstellung von Impfstoffen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C12N15/54 C12N9/10 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, DISSERTATION ABS, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	GOLDBAUM, FERNANDO A. ET AL: "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase" J. MED. MICROBIOL., VOL. 48, NO. 9, PAGE(S) 833-839, September 1999 (1999-09), XP000938445 page 835, right hand column, last paragraph; table 1 page 834	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
P,X	--- WO 99 27128 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3 June 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
P,Y	page 17, line 3 - line 10 ---	15,18,19

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2000

Date of mailing of the international search report

18.12.00

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Dullaart, A

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 26651 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3 June 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	page 17, line 27 - page 18, line 2 claims 1-11	15,18,19
P,X	WO 99 38986 A (NOVARTIS ERFINDUNGEN VERWALTUN ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DA) 5 August 1999 (1999-08-05)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	example 7	15,18,19
Y	WO 98 18917 A (FULLER TROY E ;MULKS MARTHA H (US); THACKER BRAD J (US); IOWA STAT) 7 May 1999 (1998-05-07)	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase." METHODS IN ENZYMOLOGY, 1997, VOL. 280, PART J, PAGE(S) 389-399, XP000938442 page 394 page 395, last paragraph - page 396, line 11	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	RITSERT KARL ET AL: "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis: Crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 A resolution." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 253, no. 1, 1995, pages 151 - 167, XP000929904 ISSN: 0022-2836 abstract figures 5-9 page 159, right hand column figures 11-14	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: Structure and mechanism of lumazine synthase." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 24, no. 1, 1996, pages 89 - 94, XP000929906 656th Meeting of the Biochemical Society; Dublin, Ireland; September 11-15, 1995 ISSN: 0300-5127 page 89, right hand column page 93, left hand column</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>CUSHMAN M ET AL: "Synthesis of 2,6-dioxo-(1H,3H)-9-N-ribityl purine and lumazine synthase and riboflavin synthase." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, APR 1998, VOL. 6, NO. 4, PAGE(S) 409-15, XP000938434 abstract page 409, paragraph INTRODUCTION - page 410, left hand column table 1 page 414, left hand column</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
A	<p>DECKERT G ET AL: "THE COMPLETE GENOME OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIUM AQUIFEX AEOLICUS" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 392, 26 March 1998 (26.03.98) pages 353-358, XP000867134 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>SHERWOOD R: "PROTEIN FUSIONS: BIOSEPARATION AND APPLICATION" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, vol. 9, no. 1, 1991, pages 1-3, XP000168479 ISSN: 0167-7799 the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>YON J ET AL: "PRECISE GENE FUSION BY PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 17, no. 12, 26 June 1989 (26.06.89), page 4895 XP000268572 ISSN: 0305-1048 the whole document</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53</p>

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 876 947 A (KUDRYK BOHDAN J ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) examples 1,2,3B	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 96 31617 A (JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG) 10 October 1996 (10.10.96) page 34, line 25 - page 35, line 8	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	US 5 786 179 A (FIORETTI WILLIAM C ET AL) 28 July 1998 (28.07.98) examples 1-3	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 94 13327 A (BLACK CHRISTOPHER D V ;STERLING WINTHROP INC (US); SNOW ROBERT A () 23 June 1994 (23.06.94) example 8	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	GOLDBAUM F A ET AL: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from Brucella abortus." JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Vol. 123, no. 2, October 1998 (10.98) pages 175-178, XP000929914 ISSN: 1047-8477 abstract figures page 177	15,18, 19,46-53
Y	MORTL S ET AL: "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of Escherichia coli." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, DEC 27 1996, VOL. 271, NO. 52, PAGE(S) 33201-7, XP002153694 tables 1,4 figures 1,6	15,18, 19,46-53

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	<p>JORDAN DB ET AL: "Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, JUL 30 1999, VOL. 274, NO. 31, PAGE(S) 22114-21, XP002153695</p> <p>abstract</p> <p>figures</p> <p>-----</p>	<p>15,18,</p> <p>19,46-53</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/01899

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and partly 46-53
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

No additional fees are to be reimbursed as a result of the preliminary examination according to rule 40.2(e) PCT.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and 46-53

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/01899

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims Nos.: 46-53 partially, and 1-5, 8, 11-14, 16, 17, 20, 21, 28, 31, 34

Protein conjugate, comprising a lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, methods for producing them, and their uses, in relation to lumazine synthase in the general sense, except for the other subjects of the invention.

2. Claims Nos.: 46-53 partially, and 6, 33 and 36-38

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*.

3. Claims Nos.: 46-53 partially, and 7

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to chimeric lumazine synthase from *Bacillus subtilis* and *Aquifex aeolicus*.

4. Claims Nos.: 46-53 partially, and 9-10

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Bacillus subtilis* that is modified in position 93 and/or 139.

5. Claims Nos.: 46-53 partially, and 15, 18 and 19

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to at least 2 different protein conjugates of lumazine synthase.

6. Claims Nos.: 22-24

Lumazine synthase from *Bacillus subtilis* that is modified in position 93 and/or 139.

7. Claims Nos.: 25-26

Lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*.

8. Claim No.: 27

Chimeric lumazine synthase from *Bacillus subtilis* and *Aquifex aeolicus*.

9. Claims Nos.: 46-53 partially, and 29, 30, 32, 35 and 39-45

Protein conjugate, comprising lumazine synthase as the carrier protein, corresponding DNA and vectors, and their uses, in relation to lumazine synthase from *Bacillus subtilis*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/01899

Continued from box I.2

Claims Nos.: 1-5, 8, 11-21, 38, 31, 34 and 46-53 partially

Present patent claims 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 and 46-53 relate to conjugates, to the mixtures thereof, to methods for producing them and to their uses, each time only partially characterized, namely by the carrier protein.

The claims therefore encompass all products etc. that contain said carrier protein, while only a small portion of such products etc. are supported in the description according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible.

Also, the claims lack the required clarity under Article 6 PCT as none of claims 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34, 46-53 completely characterizes a protein conjugate. Even the carrier protein is not completely defined in the claims: claims 1-2 only relate to a "capside spatial structure of the lumazine synthase type", in claim 8 said carrier protein is defined as 12 pentameric substructures the sequences of which "are preferably obtained on the basis of a comparison of a set of sequences of different lumazine synthase sequences, i.e. of sequences derived from different organisms, especially using the search algorithms according to Altschul et al. (1997)".

For this reason, the search was restricted to those parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts relating to the conjugates that are actually supported in the application by examples, restricted to the subjects of invention for which a search was carried out under the objection of lack of unity of the invention.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01899

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927128 A	03-06-1999	EP 1034296 A	13-09-2000
WO 9926651 A	03-06-1999	US 6017728 A	25-01-2000
		EP 1037661 A	27-09-2000
WO 9938986 A	05-08-1999	NONE	
WO 9818917 A	07-05-1998	US 5925354 A	20-07-1999
		AU 5155098 A	22-05-1998
		CA 2241626 A	07-05-1998
		EP 0948616 A	13-10-1999
		JP 11504662 T	27-04-1999
		ZA 9709657 A	19-08-1998
US 5876947 A	02-03-1999	AU 8503898 A	16-02-1999
		EP 1007570 A	14-06-2000
		WO 9905176 A	04-02-1999
WO 9631617 A	10-10-1996	US 5807714 A	15-09-1998
		CA 2217346 A	10-10-1996
		JP 11509723 T	31-08-1999
US 5786179 A	28-07-1998	US 5747659 A	05-05-1998
		US 5725858 A	10-03-1998
		AU 704737 B	06-05-1999
		AU 2095995 A	11-09-1995
		BR 9507426 A	16-09-1997
		CA 2184183 A	31-08-1995
		CN 1149258 A	07-05-1997
		EP 0804219 A	05-11-1997
		FI 963325 A	21-10-1996
		JP 9510702 T	28-10-1997
		NO 963572 A	25-10-1996
		NZ 282981 A	26-08-1998
		PL 316628 A	03-02-1997
		WO 9522980 A	31-08-1995
WO 9413327 A	23-06-1994	AU 5984094 A	04-07-1994
		CA 2151614 A	23-06-1994
		EP 0675737 A	11-10-1995
		JP 8507750 T	20-08-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/62 C12N15/54 C12N9/10 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, DISSERTATION ABS, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y,P	GOLDBAUM, FERNANDO A. ET AL: "The 18-kDa cytoplasmic protein of Brucella species - an antigen useful for diagnosis - is a lumazine synthase" J. MED. MICROBIOL., VOL. 48, NO. 9, PAGE(S) 833-839, September 1999 (1999-09), XP000938445 Seite 835, rechte Spalte, letzter Absatz; Tabelle 1 Seite 834	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
P,X	--- WO 99 27128 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3. Juni 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
P,Y	Seite 17, Zeile 3 - Zeile 10 ---	15,18,19
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18.12.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 99 26651 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 3. Juni 1999 (1999-06-03)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	Seite 17, Zeile 27 -Seite 18, Zeile 2 Ansprüche 1-11	15,18,19
P,X	WO 99 38986 A (NOVARTIS ERFINDUNGEN VERWALTUN ;NOVARTIS AG (CH); GUYER CHARLES DA) 5. August 1999 (1999-08-05)	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	Beispiel 7	15,18,19
Y	WO 98 18917 A (FULLER TROY E ;MULKS MARTHA H (US); THACKER BRAD J (US); IOWA STAT) 7. Mai 1998 (1998-05-07)	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	BACHET A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: lumazine synthase and riboflavin synthase." METHODS IN ENZYMOLOGY, 1997, VOL. 280, PART J, PAGE(S) 389-399, XP000938442 Seite 394 Seite 395, letzter Absatz -Seite 396, Zeile 11	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53
Y	RITSERT KARL ET AL: "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of Bacillus subtilis: Crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 253, Nr. 1, 1995, Seiten 151-167, XP000929904 ISSN: 0022-2836 Zusammenfassung Abbildungen 5-9 Seite 159, rechte Spalte Abbildungen 11-14	1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>BACHER A ET AL: "Biosynthesis of riboflavin: Structure and mechanism of lumazine synthase." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 24, Nr. 1, 1996, Seiten 89-94, XP000929906 656th Meeting of the Biochemical Society; Dublin, Ireland; September 11-15, 1995 ISSN: 0300-5127 Seite 89, rechte Spalte Seite 93, linke Spalte</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>CUSHMAN M ET AL: "Synthesis of 2,6-dioxo-(1H,3H)-9-N-ribityl purine and lumazine synthase and riboflavin synthase." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, APR 1998, VOL. 6, NO. 4, PAGE(S) 409-15, XP000938434 Zusammenfassung Seite 409, Absatz INTRODUCTION -Seite 410, linke Spalte Tabelle 1 Seite 414, linke Spalte</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
A	<p>DECKERT G ET AL: "THE COMPLETE GENOME OF THE HYPERTHERMOPHILIC BACTERIUM AQUIFEX AEOLICUS" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 392, 26. März 1998 (1998-03-26), Seiten 353-358, XP000867134 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>SHERWOOD R: "PROTEIN FUSIONS: BIOSEPARATION AND APPLICATION" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, Bd. 9, Nr. 1, 1991, Seiten 1-3, XP000168479 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53</p>
Y	<p>YON J ET AL: "PRECISE GENE FUSION BY PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 17, Nr. 12, 26. Juni 1989 (1989-06-26), Seite 4895 XP000268572 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	<p>1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53</p>

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 876 947 A (KUDRYK BOHDAN J ET AL) 2. März 1999 (1999-03-02) Beispiele 1,2,3B ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 96 31617 A (JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG) 10. Oktober 1996 (1996-10-10) Seite 34, Zeile 25 -Seite 35, Zeile 8 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	US 5 786 179 A (FIORETTI WILLIAM C ET AL) 28. Juli 1998 (1998-07-28) Beispiele 1-3 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	WO 94 13327 A (BLACK CHRISTOPHER D V ;STERLING WINTHROP INC (US); SNOW ROBERT A () 23. Juni 1994 (1994-06-23) Beispiel 8 ---	1-5,8, 11-14, 16,17, 20,21, 28,31, 34,46-53
Y	GOLDBAUM F A ET AL: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from Brucella abortus." JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 123, Nr. 2, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 175-178, XP000929914 ISSN: 1047-8477 Zusammenfassung Abbildungen Seite 177 ---	15,18, 19,46-53
Y	MORTL S ET AL: "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of Escherichia coli." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, DEC 27 1996, VOL. 271, NO. 52, PAGE(S) 33201-7, XP002153694 Tabellen 1,4 Abbildungen 1,6 ---	15,18, 19,46-53

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	<p>JORDAN DB ET AL: "Plant riboflavin biosynthesis. Cloning, chloroplast localization, expression, purification, and partial characterization of spinach lumazine synthase."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, JUL 30 1999, VOL. 274, NO. 31, PAGE(S) 22114-21, XP002153695</p> <p>Zusammenfassung Abbildungen</p> <p>-----</p>	<p>15,18, 19,46-53</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/01899

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 teilweise
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

Aufgrund des Ergebnisses der vorläufigen Überprüfung
gemäß Regel 40.2(e) PCT sind keine zusätzlichen Gebühren zu erstatten.

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 1-5, 8, 11-14, 16, 17, 20, 21, 28, 31, 34

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, Verfahren zu deren Herstellung, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase im allgemeinen Sinne, mit Ausnahme von den weiteren Erfindungsgegenstände.

2. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 6, 33 und 36-38

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus *Aquifex aeolicus*.

3. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 7

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf chimäres Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* und *Aquifex aeolicus*.

4. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 9-10

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* modifiziert an Position 93 und/oder 139.

5. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 15, 18 und 19

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren Verwendungen, bezogen auf mindestens 2 unterschiedlichen Protein-Konjugaten von Lumazinsynthase

6. Ansprüche: 22-24

Lumazinsynthase aus *Bacillus subtilis* modifiziert an Position 93 und/oder 139.

7. Ansprüche: 25-26

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Lumazinsynthase aus Aquifex aeolicus.

8. Anspruch : 27

Chimäres Lumazinsynthase aus Bacillus subtilis und Aquifex
aeolicus.

9. Ansprüche: 46-53 teilweise, und 29, 30, 32, 35 und 39-45

Protein-Konjugat, bestehend aus Lumazinsynthase als
Trägerprotein, korrespondierende DNA und Vektoren, und deren
Verwendungen, bezogen auf Lumazinsynthase aus Bacillus
subtilis.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld 1.2

Ansprüche Nr.: 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 teilweise

Die geltenden Patentansprüche 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 und 46-53 beziehen sich auf Konjugate, deren Mischungen, Verfahren zu deren Herstellung, und deren Verwendung, jeweils nur teilweise charakterisiert, d.h. durch das Trägerprotein.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die dieses Trägerprotein enthalten, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, weil in keiner der Ansprüche 1-5, 8, 11-21, 28, 31, 34 46-53 ein Protein-Konjugat vollständig charakterisiert worden ist.

Sogar das Trägerprotein ist nicht vollständig in den Ansprüchen definiert: in Ansprüchen 1-2 ist nur der Rede von einer

"Kapsid-Raumstruktur vom Lumazinsynthase-Typ", in Anspruch 8 wird dieses Trägerprotein definiert als 12 pentamere Unterstrukturen, deren Sequenz "vorzugsweise aus dem Vergleich einer Sequenzmenge verschiedener, d.h. aus verschiedenen Organismen stammenden Lumazinsynthasesequenzen, insbesondere unter Verwendung von Suchalgorithmen nach Altschul et al. (1997), gewonnen werden".

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Konjugate, die in der Anmeldung tatsächlich mit einem Beispiel unterstützt werden, beschränkt auf die Erfindungsgegenstände, die unter dem Einwand wegen mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung gesucht worden sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01899

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9927128 A	03-06-1999	EP 1034296 A	13-09-2000
WO 9926651 A	03-06-1999	US 6017728 A	25-01-2000
		EP 1037661 A	27-09-2000
WO 9938986 A	05-08-1999	keine	
WO 9818917 A	07-05-1998	US 5925354 A	20-07-1999
		AU 5155098 A	22-05-1998
		CA 2241626 A	07-05-1998
		EP 0948616 A	13-10-1999
		JP 11504662 T	27-04-1999
		ZA 9709657 A	19-08-1998
US 5876947 A	02-03-1999	AU 8503898 A	16-02-1999
		EP 1007570 A	14-06-2000
		WO 9905176 A	04-02-1999
WO 9631617 A	10-10-1996	US 5807714 A	15-09-1998
		CA 2217346 A	10-10-1996
		JP 11509723 T	31-08-1999
US 5786179 A	28-07-1998	US 5747659 A	05-05-1998
		US 5725858 A	10-03-1998
		AU 704737 B	06-05-1999
		AU 2095995 A	11-09-1995
		BR 9507426 A	16-09-1997
		CA 2184183 A	31-08-1995
		CN 1149258 A	07-05-1997
		EP 0804219 A	05-11-1997
		FI 963325 A	21-10-1996
		JP 9510702 T	28-10-1997
		NO 963572 A	25-10-1996
		NZ 282981 A	26-08-1998
		PL 316628 A	03-02-1997
		WO 9522980 A	31-08-1995
WO 9413327 A	23-06-1994	AU 5984094 A	04-07-1994
		CA 2151614 A	23-06-1994
		EP 0675737 A	11-10-1995
		JP 8507750 T	20-08-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)